



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

FRANCISCO RAFAEL ALVES SANTANA CESÁRIO

EFEITO NEUROPROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE
***Morinda citrifolia* (NONI) NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA**
POR OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS

FORTALEZA-CE

2023

FRANCISCO RAFAEL ALVES SANTANA CESÁRIO

**EFEITO NEUROPROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE
Morinda citrifolia (NONI) NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA
POR OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Lima Vale

Coorientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- C414e Cesário, Francisco Rafael Alves Santana.
Efeito neuroprotetor de uma proteína isolada de sementes de *Morinda citrifolia* (Noni) na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos / Francisco Rafael Alves Santana Cesário. – 2023.
137 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.
Coorientação: Profa. Dra. Hermógenes David de Oliveira.
1. Neuropatia Sensitiva. 2. Oxaliplatina. 3. *Morinda citrifolia*. I. Título.

CDD 615.1

FRANCISCO RAFAEL ALVES SANTANA CESÁRIO

EFEITO DE NEUROPROTETOR UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE
Morinda citrifolia (NONI) NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR
OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Lima Vale

Coorientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Meneses
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof. Dr. Álefe Brito Monteiro
Faculdade de Saúde de Paulista (FASUP)

Profa. Dra. Renata Bessa Pontes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Flávio da Silveira Bitencourt
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

A Deus.

A Minha mãe Fátima, a minha Tia Loura, a
minha Tia Maria (*in memorian*) e minha irmã
Mikaelly (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ser minha força, meu sustento, meu alicerce, minha base e por estar sempre comigo em todos os momentos, iluminando-me com sabedoria, insistência, persistência, constância e determinação para conquistar esse objetivo e meta de vida. Obrigado Senhor!

A minha mãe Fátima, por ser minha base e referência de força, persistência e coragem. Por apoiar e acreditar em mim e na busca daquilo que almejo para minha vida. Obrigado por tudo!

A minha tia Loura e minha tia Maria (*in memoriam*), por constituírem parte da minha base e sempre me apoiarem nos meus estudos, na minha educação e na minha formação profissional e como ser humano. Gratidão por tudo!

A Profa. Dra. Mariana Lima Vale, minha orientadora, por todo processo de orientação, por me ensinar a construir o pensamento e o conhecimento científico, por todos os ensinamentos durante esses quase 6 anos em que fui integrante do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer - LAFICA. Obrigado pela paciência, incentivo e presença constante durante este período. Você foi importante para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira, meu Coorientador, por todo conhecimento repassado, pela sua atenção, disponibilidade em ajudar e orientar. Obrigado por conceder e permitir estudar um dos elementos chaves na construção dessa pesquisa, que foi a McLTP1. Por ter participado da minha banca de qualificação e pelas contribuições nesta tese. Agradeço a Andrea Costa, por toda disponibilidade e todo empenho em preparar e conceder a McLTP1.

Ao Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior, pelo acolhimento no LAFICA, por fazer a ponte com a Profa. Mariana para que eu viesse me tornar pós-graduando e membro do laboratório. Obrigado por cada incentivo, apoio, parceria e disponibilidade de sempre ajudar.

As Profas. Dra. Delane Viana Gondim e Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong, obrigado pela atenção, amizade e por cada incentivo, palavra de motivação e disponibilidade de ajudar.

A Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar, por sua disponibilidade em ajudar e sempre abrir as portas do Laboratório de Bioquímica para realização dos experimentos e pela participação na minha banca de qualificação e pelas grandes contribuições neste estudo.

A Profa. Dra. Renata Bessa Pontes, por ter participado da minha banca de qualificação e pelas contribuições no aprimoramento deste estudo.

Aos alunos de iniciação científica, Cristiane Maria, Diego Bernarde, e Amanda Rocha, pela colaboração nos experimentos. A participação de vocês foi necessária e fundamental para a construção deste trabalho. Quero agradecer especialmente ao Jonas França, por todo empenho, dedicação, proatividade, assiduidade, colaboração, confiança, amizade e parceria, você foi muito importante para a realização deste trabalho. Minha gratidão eterna!

A todos os amigos do LAFICA, Livia Nobre, Bruno Freitas, Mario Lisboa, Aurilene Cajado, Célia Choquenaira, Ana Lizeth, Breno Leonardo, pela convivência diária, momentos de descontração, pelo apoio e ajuda na realização dos experimentos e construção desse trabalho.

A Anamaria Falcão, pela amizade, convivência e pelo apoio. Obrigado por todos os momentos que passamos juntos no decorrer do doutorado, dos alegres até os difíceis, e por toda ajuda e força mútua quando precisamos um do outro. Meu muito obrigado por toda ajuda nos experimentos. Compartilhar nossos momentos, fases e conquistas, fez esse período mais agradável.

A Samia Tavares, do Laboratório de Osteofarmacologia, obrigado pela colaboração, amizade, companheirismo e parceria na realização dos experimentos.

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

A Central Analítica e Unidade multiusuário da Universidade Federal do Ceará pelo apoio técnico na realização da microscopia confocal.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

A Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade.

RESUMO

EFEITO NEUROPROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DE SEMENTES DE *Morinda citrifolia* (NONI) NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS

O antineoplásico oxaliplatina apresenta como efeito neurotóxico um quadro clínico denominado de neuropatia sensitiva periférica, no qual provoca alterações nociceptivas, inflamatórias, oxidativas e morfológicas em células nervosas e compromete a qualidade de vida dos pacientes. A McLTP1, uma proteína isolada de sementes de *Morinda citrifolia* (noni), a partir de estudos anteriores, demonstrou ter efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante em estudos não clínicos. Diante disso, esse estudo buscou investigar o efeito da McLTP1 sobre a NSP induzida por oxaliplatina em camundongos. A NSP foi induzida com injeções de oxaliplatina (2 mg/kg, i.v., 2x/sem, no total 9 injeções), durante 28 dias, em camundongos Swiss (machos, 25-30g). A ação da McLTP1 (1, 2 e 4 mg/kg e 4 mg/kg diariamente) foi avaliada até o 28º ou 56º dia (1x/sem), pelos testes de hiperalgesia mecânica (teste de Von Frey), alodínia térmica ao frio (teste da acetona), envolvimento de TRPA1 ou TRPM8, comportamental e motor (teste de *Rota rod* e *Open field*), histologia (nervo ciático), imunofluorescência (c-Fos, ATF-3 e nitrotirosina) estresse oxidativo (GSH e MDA) em medula espinal ou gânglio da raiz dorsal (GRD) e leucometria (contagem de linfócitos e neutrófilos). Os resultados mostraram que a oxaliplatina aumentou a nocicepção mecânica e térmica, com envolvimento de TRPA1 e TRPM8, diminuiu a atividade comportamental exploratória, promoveu danos teciduais nervosos com migração leucocitária em nervos ciáticos, aumentou a expressão de c-Fos, ATF-3 e nitrotirosina na medula espinal ou GRD, diminuiu os níveis de GSH e aumentou MDA em medula e nervo ciático e diminuiu o número de linfócitos e neutrófilos. A McLTP1 (4 mg/kg, diariamente), diminuiu significativamente a nocicepção mecânica e térmica, envolveu TRPM8, mas não TRPA1, não reverteu a atividade comportamental exploratória reduzida provocada pela oxaliplatina, diminuiu os danos teciduais nervosos e a migração leucocitária em nervos ciáticos, diminuiu a expressão de c-Fos, ATF-3 e nitrotirosina na medula espinal ou GRD, aumentou os níveis de GSH e diminuiu MDA em medula e nervo ciático e preveniu a diminuição de linfócitos e neutrófilos. Conclui-se, portanto, que a McLTP1 pode exercer um papel neuroprotetor na NSP da oxaliplatina, tendo a participação da atividade antinociceptiva, antioxidante e proliferativa.

Palavras-chave: Neuropatia Sensitiva, Oxaliplatina, *Morinda citrifolia*.

ABSTRACT

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF A PROTEIN ISOLATED FROM SEEDS OF *Morinda citrifolia* (NONI) ON OXALIPLATIN-INDUCED PERIPHERAL SENSORY NEUROPATHY IN MICE

The antineoplastic oxaliplatin has a neurotoxic effect a clinical condition called peripheral sensory neuropathy, in which it causes nociceptive, inflammatory, oxidative and morphological changes in nerve cells and compromises the quality of life of patients. McLTP1, a protein isolated from *Morinda citrifolia* (noni) seeds, from previous studies, has been shown to have an antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant effect in preclinical studies. Therefore, this study sought to investigate the effect of McLTP1 seeds on oxaliplatin-induced PSN in mice. PSN was induced with oxaliplatin injections (2 mg/kg, i.v., 2x/weeks, in total 9 injections) for 28 days in Swiss mice (male, 25-30g). The action of McLTP1 (1, 2 e 4 mg/kg and 4 mg/kg daily) was evaluated, up to the 28th or 56th day (1x/week), through tests of mechanical hyperalgesia (Von Frey test), cold thermal allodynia (acetone test), TRPA1 or TRPM8 involvement, behavioral and motor (*Rota rod* and *Open field* test), histology (sciatic nerve), immunofluorescence (c-Fos, ATF-3 and nitrotyrosine), antioxidant (GSH and MDA) in spinal cord or dorsal root ganglion (DRG) and leucometry (count lymphocytes and neutrophils). The results showed that oxaliplatin increased mechanical and thermal nociception, with involvement of TRPA1 and TRPM8, decreased exploratory behavioral activity, promoted nerve tissue damage with leukocyte migration in sciatic nerves, increased the expression of c-Fos, ATF-3 and nitrotyrosine in the spinal cord or DRG, decreased GSH and increased MDA levels in spinal cord and sciatic nerve, and decreased the number of lymphocytes and neutrophils. McLTP1 (4 mg/kg, daily), decreased significantly mechanical and thermal nociception, involved TRPM8, but not TRPA1, did not reverse the reduced exploratory behavioral activity caused by oxaliplatin, decreased nerve tissue damage and leukocyte migration in sciatic nerves, decreased the expression of c-Fos, ATF-3 and nitrotyrosin in the spinal cord or DRG, increased GSH and decreased MDA levels in the sciatic nerve or spinal cord, and prevented the decrease of lymphocytes and neutrophils. It is concluded, therefore, that McLTP1 may exert a neuroprotective role on oxaliplatin-induced PSN, having the participation of the antinociceptive activity, antioxidant and proliferative in leukocytes activity.

Keywords: Sensory Neuropathy, Oxaliplatin, *Morinda citrifolia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reação fisioquímica do tipo não-enzimática da oxaliplatina.....	24
Figura 2	Mecanismo de ação citotóxico da oxaliplatina.....	26
Figura 3	Mecanismo de ação de morte imunogênica da oxaliplatina.....	29
Figura 4	Influxo e efluxo da acumulação de platina na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina.....	36
Figura 5	Mecanismo molecular e superexpressão do TRPM8 subjacente à hipersensibilidade ao frio na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina.....	41
Figura 6	Mecanismo molecular do TRPA1 subjacente à hipersensibilidade ao frio na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina.....	42
Figura 7	Desenho esquemático do protocolo experimental I.....	63
Figura 8	Desenho esquemático do protocolo experimental II.....	65
Figura 9	Fotomicrografias de nervo ciático de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.....	91
Figura 10	Fotomicrografias da expressão de c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1...	93
Figura 11	Fotomicrografia da expressão de c-Fos em medula espinal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.....	95
Figura 12	Fotomicrografias da expressão de ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1...	97
Figura 13	Fotomicrografias da expressão de nitrotirosina em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1...	99
Figura 14	Possíveis mecanismos na ação da McLTP1.....	114

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Efeito da McLTP1 na hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	78
Gráfico 2	Efeito da McLTP1 na alodínia térmica pelo frio em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	79
Gráfico 3	Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	80
Gráfico 4	Efeito da McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente na hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	82
Gráfico 5	Efeito da McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente na alodínia térmica pelo frio de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	83
Gráfico 6	Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	84
Gráfico 7	Efeito da McLTP1 sobre a contagem total e diferencial de leucócitos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	85
Gráfico 8	Efeito da McLTP1 administrado diariamente sobre a contagem total e diferencial de leucócitos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	86
Gráfico 9	Efeito da McLTP1 sobre neutrófilos teciduais (nervo ciático) e sanguíneos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	87
Gráfico 10	Participação dos receptores TRPA1 e TRPM8 no efeito antinociceptivo da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	88
Gráfico 11	Efeito da McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina, a partir da avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA) e Glutathiona reduzida (GSH).....	89
Gráfico 12	Quantificação da área fluorescente da expressão de c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.....	94
Gráfico 13	Quantificação da área fluorescente da expressão de c-Fos em medula	

	espinal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.....	96
Gráfico 14	Quantificação da área fluorescente da expressão de ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.....	98
Gráfico 15	Quantificação da área fluorescente da expressão de nitrotirosina em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.....	100

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Recomendação para prevenção da neuropatia periférica induzida por oxaliplatina da Sociedade Americana de Oncologia Clínica.....	45
Quadro 2	Detalhamento dos testes experimentais realizados e do número de animais utilizados no protocolo experimental I.....	64
Quadro 3	Detalhamento dos testes experimentais realizados e do número de animais utilizados no protocolo experimental II.....	66
Quadro 4	Anticorpos utilizados para imunofluorescência.....	73
Tabela 1	Escores de análise histológica dos nervos ciáticos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC2	Transportadores Cassete de Ligação de ATP da subfamília C membro 2
ACM	Avaliação comportamental motora
AGXT	Alanina Glioxilato Aminotransferase
ATF	Alodínia térmica pelo frio
ATP	Adenosina trifosfato
ATP7A e B	Adenosina Trifosfatase de Transporte de Cobre 7 Alfa e Beta
BER	Sistema de Excisão de Bases
CD	Cluster de diferenciação
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CTR	Receptor Transportador de Cobre
CTR1	Transportador de Cobre 1
DACH	Diaminociclohexano
DAMP	Padrão Molecular Associado a Danos
DEB-NTC	Critérios de Neurotoxicidade da Debiopharm
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico
EORTC-QLQ-C30	Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer
ERCC-1	Reparo por excisão de complementação cruzada do grupo 1
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
FACT-GOG-Ntx	Avaliação Funcional da Terapia do Câncer - Neurotoxicidade
FOLFOX	5-Fluorouracil, leucovorin e oxaliplatina
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
GSH	Glutathiona Reduzida
GSTP1 e M1	Glutathiona-S-Transferase P1 e M1
HM	Híperalgesia mecânica
HMGB1	Proteína de Alta Mobilidade do Grupo Caixa 1
IL	Interleucina
M6P	Manose-6-fosfato

MATE 1 e 2	Proteína de Extrusão Multidrogas de Fármacos e Compostos Tóxicos ou Toxinas 1 e 2
McLTP1	Proteína Transferidora de Lipídeos isolada das sementes de <i>Morinda citrifolia</i>
MHC-I	Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I
MISS	Sumscore Sensorial
MRP2	Proteína de Resistência a Múltiplas Drogas 2
Nav	Canal de sódio dependente de voltagem
NCI-CTC	Instituto Nacional do Câncer dos EUA
NCI-CTCAE	Eventos Adversos do Instituto Nacional do Câncer dos EUA
NER	Reparo Excisão de Nucleotídeos
NSP	Neuropatia Sensitiva Periférica
NFAT	Fator Nuclear de Células T Ativadas
NPSI	Inventário de sintomas de dor Neuropática
OATP1B1	Polipeptídeo Transportador de Ânions Ativos 1B1
OCT 1 e 2	Transportador Catiônico Orgânico 1 e 2
OCTN1 1 e 2	Transportadores de Cátion e Carnitina Novos 1 e 2
OSNS	Escala de Neurotoxicidade Específica da Oxaliplatina
OXL	Oxaliplatina
PBS	Salina Tampão Fosfato
PD-L1 e L2	Ligante da proteína de morte celular programada 1 e 2
PFA	Paraformaldeído
PKA	Proteína Quinase A
PLC	Fosfolipase C
QLQ-CIPN20	Medidas de qualidade de vida
QST	Teste Sensorial Quantitativo
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rTNS	Escore de Neuropatia Total Reduzido
SIP	Esfingosina-1-Fosfato
SISGEN	Sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado.
STAT6	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 6

TCR	Receptor de células T
TLR4	Toll- like receptor 4
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
TNSc	Escore clínico da Neuropatia Total
TPPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
TRP	Receptores de Potencial Transiente
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
TRPM8	Receptor de Potencial Transitório Melastatina 8
XELOX	Capecitabina e oxaliplatina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	Oxaliplatina.....	22
2.1.1	Mecanismos de Ação.....	24
2.1.2	Neuropatia induzida por oxaliplatina.....	29
2.1.3	Mecanismos envolvidos na neuropatia periférica associada a oxaliplatina.....	32
2.1.4	Tratamento preventivo e terapêutica da neuropatia periférica induzida por oxaliplatina.....	44
2.2	Proteína Transferidora de Lipídeos isolada das sementes de <i>Morinda citrifolia</i> - McLTP1.....	51
3	JUSTIFICATIVA.....	56
4	OBJETIVOS.....	58
4.1	Objetivo geral.....	58
4.2	Objetivos específicos.....	58
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
5.1	Coleta, identificação e obtenção do material vegetal.....	59
5.2	Extração e Purificação da Proteína De Transferidora de Lipídeos isolada de semente de <i>M. citrifolia</i> L. (Noni) - McLTP1.....	59
5.3	Drogas e Reagentes.....	60
5.4	Animais e aspectos éticos da pesquisa.....	61
5.5	Protocolos Experimentais.....	62
5.5.1	Desenho experimental para os Testes de Neuropatia Induzida por Oxaliplatina.....	62
5.5.1.1	Protocolo I.....	62
5.5.1.2	Protocolo II.....	64
5.5.2.1	Indução da neuropatia sensitiva periférica por oxaliplatina (OXL): Doses, diluição e administração de oxaliplatina.....	67
5.5.2.2	Teste de hiperalgesia mecânica plantar.....	
5.5.2.3	Avaliação da alodínia térmica ao frio.....	
5.5.2.4	Teste de atividade motora forçada.....	69
5.5.2.5	Teste de campo aberto.....	70

5.5.2.6	Avaliação da participação de receptores TRPA1 e TRPM8 no efeito antinociceptivo da McLTP1.....	70
5.5.2.7	Avaliação histológica do nervo ciático.....	71
5.5.2.8	Coleta da medula espinal e gânglio da raiz dorsal para imunofluorescência e testes bioquímicos antioxidantes.....	71
5.5.2.9	Análise por imunofluorescência em medula espinal e gânglio da raiz dorsal.....	72
5.5.2.10	Testes bioquímicos de estresse oxidativo.....	74
5.5.2.10.1	Quantificação de glutathiona reduzida (GSH).....	74
5.5.2.10.2	Determinação da produção de substâncias ácida reativa com ácido tio barbitúrico – TBARS (Malonaldeído - MDA).....	74
5.5.2.11	Leucometria total e diferencial em sangue periférico.....	75
5.5.2.12	Dosagem de Mieloperoxidase (MPO).....	76
5.5.2.13	Análise estatística e expressão dos dados.....	76
6	RESULTADOS	78
6.1	Efeito da McLTP1 (1 a 4 mg/kg) na hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	78
6.2	Efeito da McLTP1 (1 a 4 mg/kg) na alodínia térmica pelo frio em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	79
6.3	Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 (1 a 4 mg/kg) em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	79
6.4	Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, na hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	81
6.5	Efeito da McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente na alodínia térmica pelo frio de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina...	82
6.6	Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	83
6.7	Efeito da McLTP1 (4 mg/kg) sobre a contagem de leucócitos sanguíneos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	85
6.8	Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, sobre a	

	contagem de leucócitos sanguíneos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	85
6.9	Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, sobre a contagem de neutrófilos sanguíneos e dos níveis teciduais de nervos ciáticos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	86
6.10	Avaliação da participação de receptores TRPA1 e TRPM8 no efeito antinociceptivo da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	87
6.11	Efeito da McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente na peroxidação lipídica em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina, a partir dos níveis de malondialdeído (MDA) e Glutathiona reduzida (GSH).....	89
6.12	Análise histológica do efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, em nervos ciáticos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	90
6.13	Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, sobre a expressão de c-Fos no gânglio da raiz dorsal (GRD) e medula espinal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	93
6.14	Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, sobre a expressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal (GRD) de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	96
6.15	Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, sobre a expressão de nitrotirosina no gânglio da raiz dorsal (GRD) de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.....	99
7	DISCUSSÃO.....	101
8	CONCLUSÃO.....	114
9	REFERÊNCIAS.....	115

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA – UFC

1 INTRODUÇÃO

A oxaliplatina é um agente antineoplásico de terceira geração dos compostos platinos (NAGASHIMA et al., 2014; DILRUBA; KALAYDA, 2016). A oxaliplatina está incluída em regimes terapêuticos com outras drogas e constitui a primeira linha de tratamento na quimioterapia do câncer colorretal metastático (KAGIAVA et al., 2015; DILRUBA; KALAYDA, 2016), um tipo de câncer com incidência de mortalidade de 9,4%, sendo o segundo tipo mais frequente em mortalidade em todo o mundo (SUNG et al., 2021).

A oxaliplatina tem promovido também melhorias notáveis no tratamento de outros cânceres do trato digestivo, como o câncer metastático esofágico, gástrico e do pâncreas (KAWASHIRI et al., 2019, 2021; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020) e promovido grandes resultados na melhora da expectativa de vida dos pacientes (CECCHIN et al., 2018).

A oxaliplatina apresenta como principal desvantagem, uma neurotoxicidade (NAGASHIMA; et al., 2014; DILRUBA; KALAYDA, 2016) que provoca um quadro de neuropatia sensitiva periférica que pode se apresentar de forma aguda ou crônica (LOPRINZI et al., 2014; KAGIAVA et al., 2015). Essa condição clínica compromete a qualidade de vida dos pacientes em quimioterapia e a adesão ao tratamento (BREWER et al., 2016; CECCHIN et al., 2018), devido a necessidade de redução das doses prescritas ou interrupção do uso da oxaliplatina, comprometendo o tratamento antineoplásico (KAWASHIRI et al., 2019; DROTT et al., 2019) e afetando negativamente a sobrevida global (DORSEY et al., 2019).

Até o momento, nenhum determinante ou marcador genético validado de toxicidade específica da oxaliplatina para neuropatia periférica foi estabelecido. Pois a contribuição dos marcadores genéticos dos pacientes na previsão dessa toxicidade ainda é controversa devido à heterogeneidade de dados (CECCHIN et al., 2018). Atualmente, também não há biomarcadores disponíveis para avaliar, diagnosticar ou prever a suscetibilidade ou gravidade dos sintomas da neuropatia com base na duração ou dosagem da oxaliplatina (IBRAHIM; EHRLICH, 2020). Esses requisitos contribuiriam muito na previsão da toxicidade direcionando à administração de outros agentes ou na identificação de pré-tratamentos dos pacientes, o que aumentaria a segurança do tratamento (CECCHIN et al., 2018).

No que diz respeito ao controle dessa neuropatia, as recomendações incluem educação do paciente (NAGASHIMA et al., 2014), boa comunicação médico-paciente (IBRAHIM; EHRLICH, 2020), modificação no manejo das doses (tempo de infusões prolongadas, redução ou cessação das doses) (STOREY et al., 2010) e tratamento farmacológico (NAGASHIMA et al., 2014).

O tratamento farmacológico é pautado na administração de agentes neuromoduladores, como anticonvulsivantes, antidepressivos, (LOPRINZI et al., 2014; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020), opioides (NAGASHIMA et al., 2014; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020) entre outros; e na administração de outros agentes, como: amifostina, infusão iônica de Ca^{2+} e Mg^{2+} (SISIGNANO et al., 2014; KANG et al., 2020) e nutracêuticos/antioxidantes (SISIGNANO et al., 2014; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020). O tratamento farmacológico não é promissor nos resultados, tendo em vista que nenhum deles está direcionado a essa neurotoxicidade e ainda se mostram ineficazes na modulação do processo neuropático e na minimização do processo sintomatológico (LOPRINZI et al., 2014; SISIGNANO et al., 2014; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020).

Assim, pode-se afirmar que não há atualmente nenhuma recomendação de tratamento preventivo ou curativo totalmente eficaz na neurotoxicidade provocada pelo uso da oxaliplatina (HERSHMAN et al., 2014; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; SHIGEMATSU et al., 2020).

Embora muitas pesquisas tenham sido realizadas para prevenir ou tratar (SHIGEMATSU et al., 2020), bem como para melhorar os efeitos neuropáticos, a busca por agentes/compostos que atuem sobre essa neuropatia, é ainda considerada um objetivo terapêutico crucial a ser alcançado (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; SHIGEMATSU et al., 2020).

Portanto, na ausência de agentes eficazes atuais, a oportunidade de identificar tratamentos preventivos, adjuvantes ou terapêuticos seguros parece apropriada. Nesse contexto, uma abordagem científica ao estudo de compostos ou moléculas naturais pode auxiliar na identificação de produtos capazes de reduzir esse efeito colateral, bem como uma abordagem à natureza multifatorial da patogênese da neuropatia (DI CESARE et al., 2017a).

A Proteína Transferidora de Lipídeos isolada das sementes de *Morinda citrifolia* (McLTP1), uma molécula natural, tem demonstrado em estudos anteriores, efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório com modulação de citocinas pró-inflamatórias, redutor do estresse oxidativo a partir da modulação de GSH e MDA, e sobre células cancerígenas (Ovcar-8). Contudo, diante desses efeitos promissores, torna-se necessário testar e buscar investigar se a McLTP1 apresenta efeito protetor na neurotoxicidade induzida por oxaliplatina.

Diante disso, o presente trabalho, tem como proposta investigar a ação de um princípio ativo de natureza proteica, a McLTP1, quanto as suas propriedades antinociceptiva e neuroprotetora em camundongos tratados subcronicamente com oxaliplatina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Oxaliplatina

A oxaliplatina é um agente citotóxico/antineoplásico sintético que pertence à família dos sais de platina (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020), é um agente alquilante (SCAGLIOTTI; VOKES, 2018) e faz parte da terceira geração dos complexos de organoplatina (NAGASHIMA et al., 2014; DILRUBA; KALAYDA, 2016; CALLS et al., 2020).

É amplamente utilizada desde 1996 para o tratamento de tumores sólidos (KAWASHIRI et al., 2019; STAFF et al., 2019; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020) e atualmente, é um dos agentes incluso na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde usado para o tratamento de alguns tipos de tumores (STAROBOVA; VETTER, 2017; SALAT, 2020; WEI et al., 2021), sendo frequentemente usada como primeira linha de tratamento (KAGIAVA et al., 2015; DILRUBA; KALAYDA, 2016) ou como terapia adjuvante (PULVERS; MARX, 2017; SALAT, 2020) do câncer colorretal metastático (aumentando a sobrevida no estágio III e IV) (KARLSSON; ANDERSSON; JYNGE, 2017) e também para outros cânceres do trato digestivo, como o câncer metastático esofágico, gástrico e do pâncreas (PULVERS; MARX, 2017; CALLS et al., 2020; KAWASHIRI et al., 2019; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020).

Inclusa em regimes terapêuticos com outras drogas constitui o tratamento de referência (KAGIAVA et al., 2015; DILRUBA; KALAYDA, 2016), ou padrão, utilizado no protocolo FOLFOX que é composto por oxaliplatina, ácido folínico (leucovorin) e 5-fluorouracil (ANDRÉ et al., 2013; NAGASHIMA et al., 2014; STAROBOVA; VETTER, 2017; PULVERS; MARX, 2017; KARLSSON; ANDERSSON; JYNGE, 2017; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; KAWASHIRI et al., 2021), ou em outros protocolos, como no regime FOLFOXIRI que é composto por oxaliplatina, ácido folínico, de 5-fluorouracil e irinotecano (SALAT, 2020) ou no regime XELOX/CAPOX composto pela capecitabina e oxaliplatina, ou no regime que envolve a capecitabina a bevacizumabe e oxaliplatina para doenças metastáticas (ARKENAU, 2011; PULVERS; MARX, 2017).

A oxaliplatina possui estrutura química similar à cisplatina, com alteração dos grupos aminos pelo o 1,2-diaminociclohexano (ALCINDOR; BEAUGER, 2011; RIDDELL; LIPPARD, 2018) e pela presença de dicarboxilato (oxalato) em vez de cloreto como grupo de saída da cisplatina. A presença de oxalato substituindo os ligantes de cloreto melhora a

solubilidade e o 1,2-diaminociclohexano aumentam a lipofilicidade (CALLS et al., 2020). Em decorrência disso, a oxaliplatina gera mais aductos de DNA para atingir a mesma citotoxicidade da cisplatina, o que proporciona uma maior potência citotóxica contra linhagens de células cancerígenas, até contra as resistentes à cisplatina (RIDDELL; LIPPARD, 2018).

Tem como nome químico completo, oxalato-Trans-L-1,2-diaminociclohexano (DACH)-platina (SALAT, 2020), que faz referência à presença de um oxalato (chamado de grupo abandonante) e do ligante carreador, o DACH (ALCINDOR; BEAUGER, 2011), possui peso molecular de 395,278 g/mol, e um volume de distribuição no estado estacionário de 11-12 L/m² (CALLS et al., 2020), sendo ligeiramente solúvel em água, menos em metanol e insolúvel em etanol e acetona (ALCINDOR; BEAUGER, 2011).

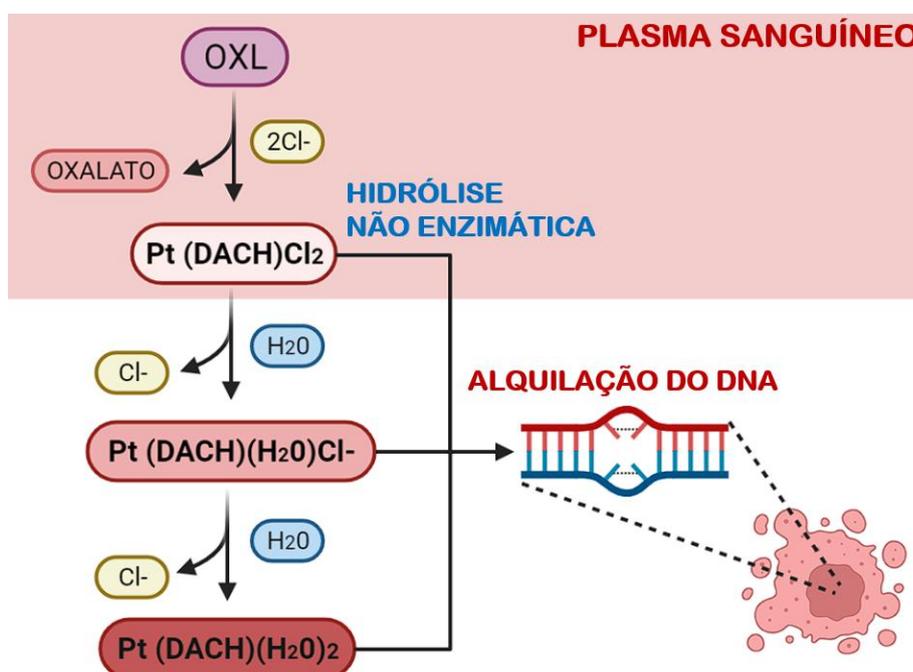
Seu metabólito ativo se liga irreversivelmente às proteínas plasmáticas e aos eritrócitos. A fração de platina não ligada às proteínas plasmáticas (5-35%) permanece inalterada e neutra devido à concentração relativamente alta de cloreto em relação ao compartimento intracelular. Logo após a infusão, 15% da platina administrada está presente na circulação sistêmica, e os 85% restantes são distribuídos nos tecidos ou eliminados por excreção renal. O declínio dos níveis de oxaliplatina é trifásico, com duas fases de distribuição: $t_{1/2\alpha}$ em 0,43 h, $t_{1/2\beta}$ em 16,8 h, e uma fase de eliminação terminal prolongada $t_{1/2\gamma}$ em 391 h após a administração (CALLS et al., 2020).

A oxaliplatina tem um melhor perfil de segurança em relação aos outros compostos platinos, sendo caracterizada por apresentar uma baixa a moderada hematotoxicidade, menor toxicidade renal (ALCINDOR; BEAUGER, 2011; NAGASHIMA et al., 2014), ototoxicidade (caracterizado por perda auditiva e o zumbido progressivo e irreversível bilateralmente em crianças) (VAN et al., 2014), reações de hipersensibilidade, e uma toxicidade gastrointestinal (caracterizada apenas por náuseas, vômitos e diarreia), um tanto diferente dos outros compostos quimioterápicos à base de platina (OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018; TRAN et al., 2015).

Geralmente é administrada por via intravenosa com vários ciclos de injeções (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020) com doses recomendadas que variam de 85 a 130 mg/m², dependendo da duração do ciclo de tratamento (CALLS et al., 2020). Em cada administração, é hidrolizada rapidamente no plasma em derivados bioativos (SALAT, 2020), em oxalato e dicloro-1,2-diaminociclohexano-platina, em concentrações fisiológicas intravasculares de HCO₃ e H₂PO₄ (ALCINDOR; BEAUGER, 2011; ZHAO et al., 2012).

Essa reação ocorre devido uma transformação fisicoquímica do tipo não enzimática, no qual ocorre deslocamento do grupo oxalato (STEIN; ARNOLD, 2012; NAKAGAWA; KANEKO, 2017; CALLS et al., 2020) por H₂O e substituição por íons cloreto do plasma sanguíneo, com liberação do composto dicloro-1,2-diaminociclohexano-platina e depois pode se transformar em compostos ou metabólitos reativos como o monoclouro diaminociclohexano (DACH) platina e diaquo diaminociclohexano (DACH) platina (ALCINDOR; BEAUGER, 2011; PEREIRA et al., 2018; CALLS et al., 2020; SALAT, 2020) responsáveis por sua ativação ou ação farmacológica (MESSORI; MARZO; MERLINO, 2015) (FIGURA 1).

Figura 1 – Reação fisicoquímica do tipo não enzimática da oxaliplatina



Fonte: autor do estudo. A Figura apresenta a reação fisicoquímica do tipo não enzimática da oxaliplatina. Pt(DACH)Cl₂: dicloro-1,2-diaminociclohexano-platina; Pt(DACH)(H₂O)Cl⁻: monoclouro-diaminociclohexano; Pt(DACH)(H₂O)₂: diaquo-diaminociclohexano-platina.

2.1.1 Mecanismos de Ação

O mecanismo de ação citotóxico da oxaliplatina se caracteriza por quatro etapas principais: captação celular, aquação e ativação, platinação do DNA e processamento celular das lesões de Pt-DNA, levando à apoptose celular (CALLS et al., 2020)

Os compostos de dicloro-DACH-platina formados no plasma (ALCINDOR; BEAUGER, 2011) ou a própria oxaliplatina é transportada para dentro da célula tumoral por transporte passivo por meio da membrana plasmática (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020;

CALLS et al., 2020), ou por transporte ativo através de transportadores catiônicos da família OCT (Transportador Catiônico Orgânico), como OCT1 e OCT2, ou CTR1 (Transportador de Cobre 1) (HARRACH; CIARIMBOLI, 2015; CALLS et al., 2020) ou transportadores de cátion e carnitina novos OCTN1 e OCTN2 (CERESA; CAVALETTI, 2011; JONG et al., 2011; LIU et al., 2013; NISHIDA et al., 2018). Sua concentração intracelular, por sua vez, é regulada por ATP7A (adenosina trifosfatase 1 de transporte de cobre alfa) e ATP7B (adenosina trifosfatase 2 de transporte de cobre beta), que são ATPases de transporte de cobre e medeiam também seu efluxo (STAROBOVA; VETTER, 2017).

A oxaliplatina tem distintos alvos dentro da célula tumoral, tendo como finalidade levar à sua disfunção e morte por apoptose. Dentro da célula, a molécula ao ser hidratada (mono ou di-hidratada) torna-se ativada e reativa (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; CALLS et al., 2020).

A partir disso, pode ocorrer efeitos genômicos, no qual ao entrar no núcleo (SPROWL et al., 2013), a molécula de platina ativada e reativa reage com regiões nucleofílicas nas bases purinas do DNA, especialmente na posição N7 das nucleobases guanina e adenina (CALLS et al., 2020), porém, acredita-se que a oxaliplatina apresente um tropismo maior e peculiar por guaninas, formando monoadductos e depois biadductos (ALCINDOR; BEAUGER, 2011). Após reagir com regiões nucleofílicas, ocorre a formação de ligações cruzadas intra e inter fitas de DNA (SCAGLIOTTI; VOKES, 2018; CALLS et al., 2020), provocando aductos (DNA-platina) induzindo distorções estruturais (SPROWL et al., 2013) tanto com o DNA nuclear como o mitocondrial (nDNA e mtDNA, respectivamente) (FIGURA 2) (RIDDELL; LIPPARD, 2018; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; CALLS et al., 2020).

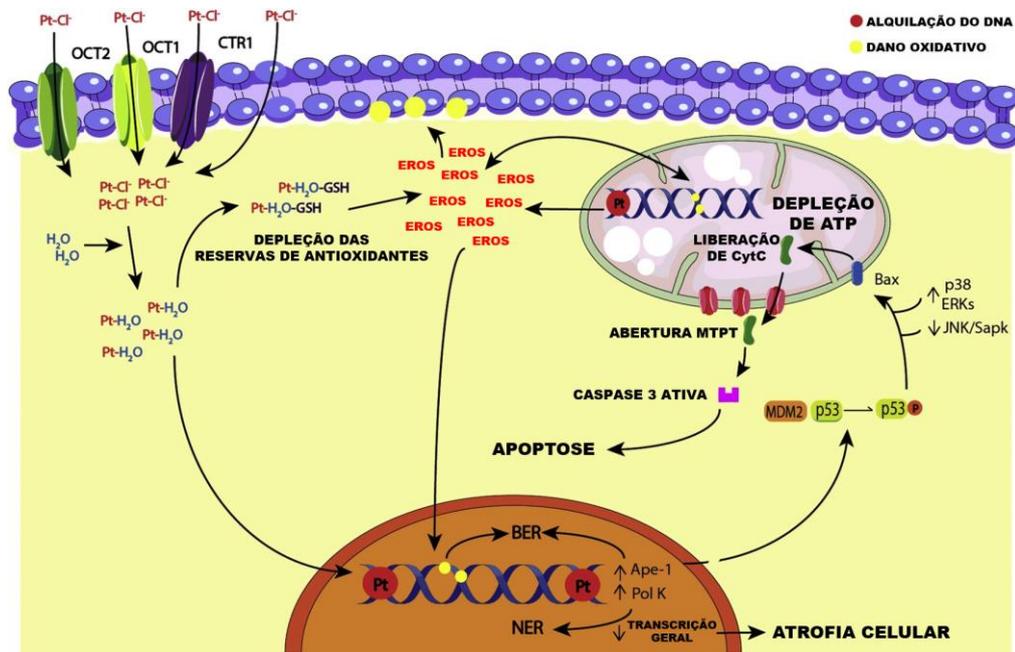
No DNA nuclear, os aductos podem levar a alterações no DNA como, interrupção da síntese do DNA, inibição da síntese do RNAm, inibição de RNA polimerases e criação de aductos de DNA nucleossômicos, conseqüentemente inibindo ou bloqueando a transcrição e replicação do DNA na fase S do ciclo celular (ALCINDOR; BEAUGER, 2011). Essas alterações levam a danos ou lesões ao DNA que podem ultrapassar a própria capacidade de reparo celular, fazendo a célula entrar na cascata apoptótica pelo não-reparo aos danos estruturais do DNA, antes mesmo de que ocorram as outras alterações (SCAGLIOTTI; VOKES, 2018; CALLS et al., 2020). Foi visto que a quantidade de aductos de Pt-DNA são correlacionados com a diminuição global nos níveis de transcrição nas células tumorais e com a quantidade de fenômenos apoptóticos (YAN et al., 2015; CALLS et al., 2020).

A platinação do nDNA causa a ativação das vias BER e NER (Proteínas de reparo por excisão base e Proteínas de reparo por nucleotídeos, respectivamente) por meio da atividade

da pol K (DNA polimerase kappa), por outro lado, aumenta a expressão da proteína Ape-1 e consequentemente induz a ativação do p53, causando a liberação do citocromo C (CytC) das mitocôndrias e ativação da caspase-3. Todos esses fenômenos, juntamente com uma desregulação dos mecanismos pró e antiapoptóticos da célula, resultam em morte celular por apoptose (FIGURA 2) (ZHUO; GORGUN; ENGLANDER, 2018; CALLS et al., 2020).

No DNA mitocondrial, como este não conta com um sistema de reparo, são especialmente danificados, maior do que o DNA nuclear. Portanto, os aductos (DNA-platina) podem levar a inibição da replicação e da transcrição ainda maior, causando intensamente alterações na cadeia respiratória, aumento na formação e produção de ERO's (Espécies Reativas de Oxigênio), o que consequentemente aumenta o estresse oxidativo (FIGURA 2) (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; CALLS et al., 2020), e leva a uma falha na sua função global, além de dano mitocondrial severo a nível morfológico e fisiológico (CALLS et al., 2020).

Figura 2 – Mecanismo de ação citotóxico da oxaliplatina



Fonte: adaptada de Calls et al., (2020). A figura representa o Mecanismo de ação citotóxica da oxaliplatina. APE1: Enzima endonuclease apirimidílica 1; ATP: Adenosina trifosfato; BER: Proteína de reparo por excisão base; CytC: Citocromo C; CTR1: Transportador de cobre 1; ERK: Quinase regulada por sinal extracelular; ERO's: Espécies reativas de oxigênio; GSH: glutationa reduzida; JNK: Jun amino-terminais quinases; MDM2: minuto duplo murino 2; NER: Proteína de reparo por nucleotídeos; OCT1 e OCT2: Transportadores catiônicos orgânico 1 e 2; polK: DNA polimerase kappa; SAPK: Proteínas quinases ativadas por estresse.

Pode ocorrer também efeitos não genômicos, onde as moléculas de platina hidratadas se ligam a espécies endógenas de baixo peso molecular e moléculas nucleofílicas, como a

glutationa (GSH), metionina, metalotioneínas e outras proteínas ricas em cisteína (CALLS et al., 2020), no qual leva a depleção de estoques e reservas antioxidantes citoplasmáticas, aumento da concentração de ERO's intracelulares responsáveis pela peroxidação de lipídios e proteínas e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, entre outros (FIGURA 2) (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; CALLS et al., 2020).

Além disso, o aumento dos níveis de ERO's é agravado pelo esgotamento das reservas antioxidantes e devido à geração de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila que desempenham um papel fundamental no dano celular (CALLS et al., 2020). Como consequência, ocorre uma oxidação maciça e intensa de componentes celulares como mitocôndrias, proteínas, lipídios e DNA (CALLS et al., 2020).

Esses eventos, por sua vez, explicam o efeito resultante ou como resultado do estresse oxidativo celular, proposto como uma das principais causas de toxicidade que contribuem para a morte de células tumorais (KARLSSON; ANDERSSON; JYNGE, 2017).

Todos esses fenômenos supracitados (danos ao DNA e estresse oxidativo) contribuem para morte por apoptose das células tumorais (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020), ou seja, a oxaliplatina exerce seu efeito citotóxico pela indução de apoptose intracelular, no qual é considerado um efeito não inflamatório e não imunogênico.

Porém, a apoptose citotóxica não imunogênica (também chamada não-calreticulina) pode ativar a apoptose imunogênica (calreticulina) (TESNIERE et al., 2010). Após a exposição à oxaliplatina, algumas células tumorais ao entrarem em processo de apoptose, lançam sinais imunogênicos na superfície extracelular da membrana plasmática (ALCINDOR; BEAUGER, 2011), como a proteína calreticulina, que é um fator de exposição pré-apoptótica da célula e é aumentada pela oxaliplatina (TESNIERE et al., 2010), que serve como um sinal para as células dendríticas engolirem a célula apoptótica (HATO et al., 2014).

As células ao entrarem em morte celular e a própria oxaliplatina, aciona a liberação do fator de exposição pós-apoptótico, o HMGB1 (proteína de alta mobilidade do grupo caixa 1), do núcleo para a superfície extracelular (FIGURA 3), que pode interagir com TLR4 das células dendríticas mediando a ativação, maturação e levando a um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (TESNIERE et al., 2010; HATO et al., 2014). Outro fator é o ATP que atua recrutando mais células dendríticas para o local do tumor, maturando-as e levando ao aumento da expressão das moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86). Diante disso, a calreticulina e a HMGB-1 leva ao desencadeamento de mais reações imunológicas que culmina na morte imunogênica das células tumorais (TESNIERE et al., 2010; HATO et al., 2014) (FIGURA 3).

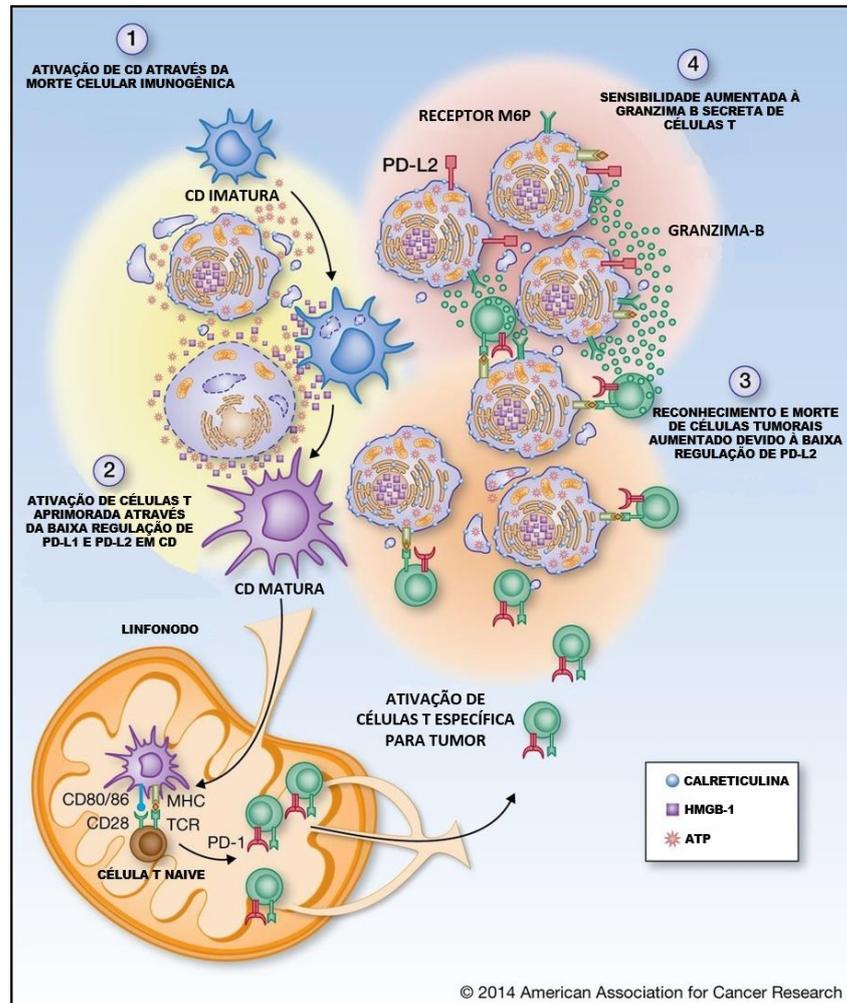
Algumas células tumorais fragmentadas no processo de morte celular são fagocitadas pelas células dendríticas, que passam de células imaturas para células maduras, e passam a expressar os antígenos tumorais na superfície da membrana plasmática. Essas células dendríticas maduras ao migrarem para os linfonodos apresentam os antígenos tumorais aos linfócitos T, que por sua vez, são ativados (HATO et al., 2014) (FIGURA 3).

O aumento da ativação das células T, ocorre pela regulação negativa de PD-L1 ou PD-L2 (Ligante da proteína de morte celular programada 1 e 2) nas células dendríticas (HATO et al., 2014). Essa regulação negativa é regulada pela via de sinalização IL-4/STAT6, onde a interleucina IL-4 ao ligar-se ao seu receptor fosforila a STAT6 no citoplasma seguida de dimerização de monômeros de STAT6 e translocação para o núcleo, promovendo transcrição de genes alvo do STAT6, como PD-L2. A oxaliplatina promove perda ou inibição da fosforilação de STAT6, o que regula negativamente a PD-L2 (LESTERHUIS et al., 2011) (FIGURA 3).

A apresentação dos antígenos aos linfócitos ocorre por meio da ligação concomitante das moléculas de MHC-I (com antígeno) e CD80/86 na membrana das células dendríticas com as moléculas TCR e CD28 respectivamente na membrana dos linfócitos. Esses linfócitos ao interagirem com as células dendríticas também podem gerar interação com receptores Toll Like 4 (TLR4) e promoverem a produção de interferon γ , no qual ativam os linfócitos T. Esses linfócitos vão atuar funcionando como uma vacina contra o tumor (HATO et al., 2014) (FIGURA 3).

Essas interações promovem a ativação e expansão policlonal de linfócitos T citotóxicos efetores específicos para os antígenos antitumorais que migram para microambiente tumoral, aumentando o reconhecimento e a morte celular devido a regulação negativa de PD-L2 e regulação positiva dos receptores M6P nas células tumorais resultando em melhor reconhecimento pelas células T ativada, o que conseqüentemente leva a uma maior lise das e instabilidade das células tumorais devido a liberação de granzimas B pelos linfócitos T ativados (HATO et al., 2014) (FIGURA 3).

Figura 3 – Mecanismo de ação de morte imunogênica da oxaliplatina



Fonte: adaptada de Hato et al. (2014). A figura representa o mecanismo de ação de morte celular imunogênica da oxaliplatina. ATP: Adenosina trifosfato; CD: Célula dendrítica; HMGB-1: Box 1 do grupo de alta mobilidade; M6P: Manose-6-fosfato; MHC: Complexo principal de histocompatibilidade; PD-1: Proteína morte programada 1; TCR: Receptor de antígeno de célula T.

A oxaliplatina também pode exercer seu efeito imunogênico acionando o sistema imunológico sistêmico, como ativação de células imunes (macrófagos, linfócitos T e monócitos) e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020) fortalecendo ainda mais a morte imunogênica.

2.1.2 Neuropatia periférica associada a oxaliplatina

A oxaliplatina, assim como outros compostos platinos, têm baixa especificidade para células cancerosas, afetando também células normais, isso se deve em parte por sua absorção mediada por transportadores em células-alvo e não-alvo, no qual acaba provocando os efeitos

tóxicos ou efeitos colaterais, como nefro, oto (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020) e mielotóxicos (STAROBOVA; VETTER, 2017).

A principal desvantagem de seu uso é o seu efeito neurotóxicos (NAGASHIMA; et al., 2014; LOPRINZI, et al., 2014) no qual provoca um quadro de neuropatia sensitiva periférica, que é considerado um efeito colateral comum de compostos quimioterapêuticos à base de platina (ZHAO et al., 2012; LOPRINZI, et al., 2014) e é uma síndrome dolorosa, complexa e desafiadora (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017).

A ocorrência dessa neuropatia na clínica oncológica é um critério de modificação do esquema quimioterápico dependendo do grau atingido. Para identificar e avaliar a ocorrência e a severidade vários instrumentos são utilizados. Dentre eles, os mais utilizados são: Critérios de Toxicidade Comuns do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (NCI-CTC), Critérios de Terminologia Comum para Eventos Adversos do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (NCI-CTCAE) (PULVERS; MARX, 2017; EL-FATATRY et al., 2018) e Escala de Neurotoxicidade Específica da Oxaliplatina (OSNS) (PARK et al., 2009). Estudos anteriores do nosso grupo estimou e padronizou métodos de avaliação associadas a Von frey eletrônico com intuito de usá-las como um instrumento de avaliação objetiva para neuropatia periférica induzida por oxaliplatina na clínica (GODINHO, et al., 2020; GODINHO, et al., 2021)

Aproximadamente 70% dos pacientes que recebem a quimioterapia com oxaliplatina desenvolvem neuropatia dentro de um mês de tratamento. A incidência e as complicações associadas podem variar dependendo dos fatores de riscos clínicos, como: comorbidade ou condições médicas presentes no paciente, como abuso de álcool, diabetes (BEIJERS; MOLS; VREUGDENHIL, 2014; NAKAGAWA; KANEKO, 2017; PULVERS; MARX, 2017), obesidade (BAO et al., 2016), tabagismo, baixo índice de massa corporal (ALEJANDRO et al., 2013; OTTAIANO et al., 2016) e dose utilizada (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020), dose cumulativa, duração do tratamento ou número de ciclos, drogas concomitantes (BEIJERS; MOLS; VREUGDENHIL, 2014; NAKAGAWA; KANEKO, 2017), baixo peso corporal, área de superfície corporal $>2,0\text{m}^2$, idade jovem (<60 anos), sexo (mulheres), neuropatia em ciclo anterior (ou ciclos iniciais) (PULVERS; MARX, 2017; SALAT, 2020), temperatura (inverno), habitação, estilo de vida e fatores ocupacionais, dor evocada pelo frio e a intensidade dos sintomas de neuropatia na fase aguda (ciclos 3 e 6 do FOLFOX), hipomagnesemia, hipercalcemia, hiperalbuminemia, anemia ou baixos níveis de hemoglobina (PULVERS; MARX, 2017), histórico de neuropatia progressiva (como por exemplo, neuropatia

diabética, nutricional), déficit na função renal com depuração de creatinina reduzida, histórico de tabagismo, níveis séricos de fatores de crescimento circulantes (SERETNY et al., 2014).

Alguns fatores de risco genéticos também podem estar associados ao desenvolvimento da neuropatia e eles podem influenciar desde a absorção, distribuição, metabolismo até a excreção da oxaliplatina. Um exemplo disso, são as alterações ou polimorfismos nos genes das enzimas do citocromo P450, genes de glutatona transferases (SALAT, 2020), como glutatona-S-transferase P1 (GSTP1, enzima de conjugação de compostos hidrofóbicos e eletrofílicos com a glutatona e é um dos genes candidato mais frequentemente investigado) e glutatona-S-transferase M1 (GSTM1) (ALEJANDRO et al., 2013; CLIF et al., 2017), do gene do ABCC2 (transportadores cassete de ligação de ATP da subfamília C membro 2, que codifica a proteína de resistência a múltiplas drogas 2 (MRP2)) (CLIF et al., 2017), dos genes AGXT (alanina glioxilato aminotransferase, uma enzima envolvida no metabolismo de oxalato) (STAROBOVA; VETTER, 2017) e dos genes ERCC-1 (reparo por excisão de complementação cruzada do grupo 1) (INADA et al., 2010).

Além dos genes que codificam canais, como: os genes SCNAs que codificam canais Nav, como SCN4A (codifica NaV1.4), SCN10A (codifica NaV1.8), SCN9A (codifica Nav1.7) (ARGYRIOU et al., 2013; SERENO et al., 2017) e os genes que codificam os canais OATP1B2 (um transportador independente de sódio expresso seletivamente na membrana plasmática, no qual em humanos se apresenta OATP1B1, um polipeptídeo transportador de ânions ativos 1B1) e canais OCTN2 (FUJITA et al., 2019; SPROWL et al., 2016).

Nenhum fator de risco clínico foi identificado de forma consistente e confiável nos estudos além da associação com a dose de oxaliplatina. Uma investigação e análise mais aprofundada sobre esses fatores de riscos poderiam fornecer informações sobre medidas de prevenção e tratamento da neuropatia ocasionada pela oxaliplatina (PULVERS; MARX, 2017). Além disso, nenhum preditor genético confiável e seguro também foi identificado, mesmo com uma extensa investigação e frequentes estudos farmacogenéticos neurotóxicos para a oxaliplatina, tanto em humanos como em camundongos (TERRAZZINO et al., 2015; MARMIROLI et al., 2017; MAHMOUDPOUR et al., 2018; STAFF et al., 2019). Várias associações genéticas foram relatadas, mas não foram validadas posteriormente. Isso pode ocorrer, devido à administração de oxaliplatina resultar em neurotoxicidade diferentes, não permitindo ou conseguindo identificar associações genéticas relevantes (MARMIROLI et al., 2017).

A neuropatia periférica induzida por oxaliplatina é considerado um efeito moderado a grave que se intensifica ao longo do tempo (ZHAO et al., 2012), causando um grave

desconforto, se apresentando com déficits nas funções sensoriais, motoras e função autônoma. Os sintomas dependem principalmente dos nervos envolvidos (LOPRINZI, et al., 2014; BREWER et al., 2016) e podem prejudicar gravemente na qualidade de vida dos pacientes sobreviventes do câncer, com impacto importante e prolongado (LOPRINZI, et al., 2014; BREWER et al., 2016; FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017; CECCHIN et al., 2018) relacionado a alterações no estilo de vida (BEIJERS et al., 2014) com aumento da necessidade de ajuda de outras pessoas e mudanças na função emocional, cognitiva e social (MOLS et al., 2013, 2014).

Os processos fisiopatológicos dessa condição clínica são multifatoriais e envolvem desde a formação de aductos de DNA, estresse oxidativo com acumulação de espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunção mitocondrial (STAFF et al. 2019; SEKIGUCHI, KAWABATA, 2020), deficiências nas estruturas celulares (BOYETTE-DAVIS et al., 2018), suprarregulação transcricional ou funcional de canais de iônicos dependentes de voltagem (SEKIGUCHI, KAWABATA, 2020) com alteração da homeostase dos íons, mecanismos apoptóticos, processos imunológicos e neuroinflamatórios com interações neuroimunes, até a degeneração axonal (STAROBOVA; VETTER, 2017; STAFF et al. 2019) com perda de terminais (BOYETTE-DAVIS et al., 2018) na medula espinhal, gânglio da raiz dorsal (GRD) e neurônios sensoriais periféricos dos nervos periféricos que leva a neuropatia sensorial (SEKIGUCHI, KAWABATA, 2020). São essas mudanças na fisiologia e morfologia molecular que resultam no desenvolvimento e nos sintomas da neuropatia induzida por oxaliplatina (STAROBOVA; VETTER, 2017).

Essa neuropatia é classificada em dois tipos ou formas distintas, a partir de suas características clínicas e mecanismos diferentes (KANG et al., 2020) ou a partir do perfil dos sintomas neurológicos e do seu tempo de início em: aguda e crônica (ZHAO et al., 2012; KAGIAVA et al., 2015; EWERTZ; QVORTRUP; ECKHOFF, 2015; PULVERS; MARX, 2017). A aguda, normalmente pode aparecer logo após a injeção da oxaliplatina na quimioterapia e, geralmente, é transitória, e a crônica, é dose cumulativa, podendo aparecer durante e permanecer mesmo após o término do tratamento antineoplásico (DROTT et al., 2019).

A forma aguda é bastante frequente (LOPRINZI, et al., 2014; CAVALETTI; MARMIROLI, 2020), com uma incidência de 85 a 98% (ARGYRIOU, et al., 2013; SERETNY et al., 2014; ARGYRIOU, 2015; STAROBOVA; VETTER, 2017; GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018). É provável que essa incidência seja

devido a diferenças nas doses iniciais de oxaliplatina, diferentes combinações de drogas e intervalos de dosagem (GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018).

Ocorre principalmente após a primeira dose ou primeiro ciclo (GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018) em uma dose variando de 85 a 130 mg/m² (ARGYRIOU, 2013, 2015; GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018). Pode ocorrer durante a infusão ou dentro de horas (dentro de 24 horas) (PACHMAN, et al., 2015; GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018) ou dias após a infusão da oxaliplatina (ZHAO et al., 2012, 2014; NAGASHIMA; et al., 2014) com pico no terceiro dia, e dura alguns dias (geralmente de 7 dias a ≤ 14 dias) (GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018; ALBERTI et al., 2014, 2020), recorrendo com infusões subsequentes (ALBERTI et al., 2020). Pode estar associado também a cada dose (LOPRINZI, et al. 2014), podendo ocorrer, inclusive com baixas doses cumulativas totais em curto período (ZHAO et al., 2012). Essa neuropatia é irreversível em menos de 5% dos casos (ALCINDOR; BEAUGER, 2011) e causa comprometimento funcional em 43% dos pacientes (GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018).

Embora a forma aguda da neuropatia tende a enfraquecer entre os ciclos de tratamento, a exposição prolongada, contínua e cumulativa a essa droga geralmente leva ao desenvolvimento da forma crônica da neuropatia (MOLASSIOTIS et al., 2019). A forma aguda esta fortemente associada ao desenvolvimento da neuropatia crônica (LOPRINZI, et al., 2014; VELASCO et al., 2015; TANISHIMA et al., 2017; STAFF et al., 2019).

Pois, os casos de sintomas graves específicos da neuropatia aguda (no primeiro ciclo ou outros ciclos de terapia) prever ou predizem o desenvolvimento e a apresentação mais grave da neuropatia sensorial crônica (MOLS, et al., 2013; TOFTHAGEN et al., 2013; ARGYRIOU et al., 2013; PACHMAN, et al., 2015; STAFF et al., 2019). A hiperexcitabilidade aguda da membrana provocada pelo oxalato, também se torna um forte preditor ou indicador de lesão crônica do nervo periférico induzida por oxaliplatina (GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018).

A outra forma distinta de neuropatia periférica provocada pela oxaliplatina é a crônica. Essa se caracteriza por ser uma neurotoxicidade do tipo dose cumulativa, dose limitante e/ou dependente da dose (NAGASHIMA et al., 2014; LOPRINZI et al., 2014; IBRAHIM; EHRLICH, 2020) puramente progressiva e consequente da exposição periódica da oxaliplatina ao longo do tempo (CALLS, et al., 2010) podendo ocorrer com a repetição dos ciclos de quimioterapia (SOVERI et al., 2019) em uma dose cumulativa variando entre 510 a

1800 mg/m² (STOREY et al., 2010; ARGYRIOU et al., 2012) com uma incidência de 40 a 93% (média de 73%) dos pacientes (ARGYRIOU et al., 2013; COLVIN, 2019).

Após a quimioterapia pode ocorrer em aproximadamente 42 a 70% após 4 a 6 ciclos após a quimioterapia. (MOLASSIOTIS et al., 2019; SOVERI et al., 2019). Os sintomas podem piorar ou surgir de semanas a vários meses após a conclusão da terapia e a prevalência estimada desses sintomas persistentes é de aproximadamente 60%, (ou seja, mais da metade de todos os pacientes) (MIASKOWSKI et al., 2017; GADGIL et al., 2019), no primeiro e terceiro mês, seja a oxaliplatina isolada ou em combinação, 30% continuando a sofrer no sexto mês ou permanentemente (SERETNY et al., 2014), 26-46% dos pacientes em 12 meses, 24% dos pacientes em 15–18 meses (BEIJERS; MOLS; VREUGDENHIL, 2014), e 84% dos pacientes em 24 meses (BRIANI et al., 2014; KOKOTIS et al., 2016)

A recuperação dos sintomas é incompleta (BRIANI et al., 2014; VELASCO; BRUNA, 2014; KOKOTIS et al., 2016) podendo ser reversível parcialmente em torno de 80% dos pacientes e reversível totalmente em torno de 40% em 6 a 8 meses após o término ou interrupção da quimioterapia (ARGYRIOU et al., 2012). No entanto, pode perdurar até cinco anos ou mais após a cessação da oxaliplatina (KOKOTIS et al., 2016) em quase 35% dos pacientes (ARGYRIOU et al., 2012).

A neuropatia crônica se desenvolve em quase todos os pacientes e se intensificam ao longo do tempo, causando uma neuropatia grave com desconforto crônico (ZHAO et al., 2012; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020). Em decorrência disso, é a forma crônica que é o problema geral de limitação da dose e a principal causa da interrupção completa do tratamento com oxaliplatina, muito mais que a forma aguda (PARK et al., 2013). É uma das principais causas de incômodo e dor contínua (FARGUHAR-SMITH; BROWN, 2016) sendo geralmente mais problemática (LOPRINZI et al., 2014) e que pode afetar substancialmente a qualidade de vida (PACHMAN, et al., 2015; CVALETTI; MARMIROLI, 2020).

Economicamente, é a neuropatia que mais sobrecarrega os pacientes e o sistema de saúde, e muitas vezes leva à perda de empregos (PIKE et al., 2012) e dificuldade de voltar ao trabalho após o tratamento (ZANVILLE et al., 2016) em detrimento muitas vezes, do comprometimento funcional que ocorre em torno de 15% dos pacientes que recebem uma dose cumulativa de 780 a 850 mg/m² (ARGYRIOU, 2015; PULVERS; MARX, 2017; STAFF et al., 2019).

2.1.3 Mecanismos envolvidos na neuropatia periférica associada a oxaliplatina

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na neuropatia periférica aguda ou crônica é limitado e os mecanismos não estão totalmente elucidados (CAVALETTI; MARMIROLI, 2020). Sabe-se que por apresentar como característica seu efeito neurotóxico cumulativo, acredita-se que tanto a forma aguda como a crônica podem estar relacionado com à acumulação da oxaliplatina, principalmente nos neurônios sensitivos dos GRD's (SPROWL et al., 2013; HARRACH et al., 2015; WEI et al., 2021).

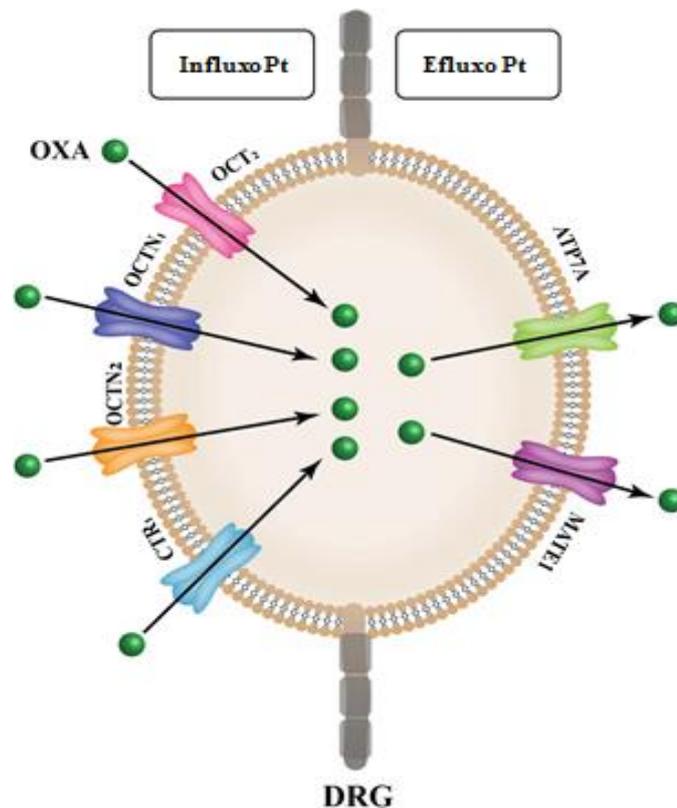
O sistema nervoso periférico (os GRD's, em especial) não possuem a proteção da barreira hematoencefálica, do sistema linfático de drenagem e líquido cefalorraquidiano, com isso as drogas quimioterápicas como a oxaliplatina, entram facilmente nos corpos das células neuronais dos GRD's resultando em estresse oxidativo, danos neurológicos e no grau de neurotoxicidade após a administração repetida de oxaliplatina (ARETI et al., 2014; APOSTOLIDIS, 2017; NISHIDA et al., 2018; FUJITA et al., 2019; WEI et al., 2021). Esse acúmulo de platina principalmente no GRD, é considerado um passo fundamental no desenvolvimento dessa neurotoxicidade (APOSTOLIDIS, 2017; NISHIDA et al., 2018; FUJITA et al., 2019; WEI et al., 2021).

Essa acumulação ocorre pelo transporte por meio de canais OCTs, em particular o OCT2 (SPROWL et al., 2013; HARRACH et al., 2015), no qual a oxaliplatina é um excelente substrato e é transportado efetivamente por esse canal para os corpos celulares dos neurônios DRG aumentando significativamente a citotoxicidade (MATSUI et al., 2020; WEI et al., 2021). Outros estudos têm mostrado que o OCTN1 expresso em neurônios dos gânglios da raiz dorsal, também é considerado um dos principais contribuintes para o acúmulo neuronal de oxaliplatina e como mediador de sua neurotoxicidade (JONG et al., 2011; NISHIDA et al., 2018; HU et al., 2019) (FIGURA 4).

O CTR1 também desempenha um papel importante na absorção, acumulação e toxicidade da oxaliplatina (CERESA; CAVALETTI, 2011) sendo um dos principais geradores de atrofia do corpo celular dos neurônios dos GRD's (WEI, et al., 2021). Outros transportadores como OCT1, CTR2 e OCTN2 também podem estar fortemente envolvidos (CERESA; CAVALETTI, 2011; HU et al., 2019). Os transportadores ATP7A e ATP7B também regula o equilíbrio intracelular da oxaliplatina nos neurônios do GRD, assim como no mecanismo antitumoral, mediando a exsudação ou efluxo de oxaliplatina (TADINI-BUONINSEGNI et al., 2014; HU et al., 2019). Os transportadores MATE 1 e 2 (Proteína de extrusão multidrogas de fármacos e compostos tóxicos ou toxinas 1 e 2) também podem estar

envolvidos no controle intracelular por efluxo da oxaliplatina. A oxaliplatina é um bom substrato para MATE 1 e o acúmulo, citotoxicidade e neurotoxicidade desta foram relatados como sendo regulados por MATE1 (FUJITA et al., 2019). A oxaliplatina também é um bom substrato de MATE2, embora os estudos não confirmem totalmente sua ação na neuropatia (YONEZAWA, 2012) (FIGURA 4).

Figura 4 – Influxo e efluxo da acumulação de platina na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina.



Fonte: adaptada de Wei, et al. (2021). A figura representa o Influxo e efluxo da acumulação de platina no GDR na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina. OCT2, OCTN1/2, CTR1 podem participar do influxo de oxaliplatina. ATP7A e MATE1 podem participar do efluxo de oxaliplatina. ATP7A: adenosina trifosfatase 1 de transporte de cobre alfa; CTR1: Transportador de Cobre 1; OCT2: Transportador Catiônico Orgânico; OCTN1/2: transportadores de cátion e carnitina novos 1 e 2; MATE1: Proteína de extrusão multidroga de fármacos e compostos tóxicos ou toxinas 1.

A formação e acumulação de aductos de platina (ZHAO et al., 2012) com o DNA nuclear causa danos aos mesmos (KANG et al., 2020). Esses danos requerem dos neurônios dos DRGs um alto nível de reparo e transcrição ativa para manter sua estrutura e função normais, porém essas funções estão inibidas tanto pelo acúmulo de platina, como pelo próprio dano ao DNA que leva à parada transcricional global das células neuronais, promovendo ativação das vias de apoptose e levando à atrofia neuronal (MCKEAGE et al., 2011; YAN et al., 2015; RIDDELL, 2018; WEI, et al., 2021) devido à reentrada aberrante na via do ciclo

celular. Acredita-se que esse seja o mecanismo de incitação primária que leva a danos crônicos aos neurônios DRG (STAFF et al., 2019).

A oxaliplatina também está envolvida no comprometimento da via de reparo por excisão de base do DNA no sistema nervoso sensorial, onde nessa via, a enzima endonuclease apirimidínica/fator efetor redox 1 (APE1/Ref1), muito sensível ao redox, muito importante na remoção das bases danificadas e estabilidade genômica, e no aumento do reparo de excisão de base do DNA, tem seus níveis reduzidos contribuindo para neurotoxicidade (KELLEY et al., 2014, 2016; BOYETTE-DAVIS et al., 2018). Sugere-se que esses níveis reduzidos podem ser decorrentes da ação superexpressa do TNF- α liberado pela ativação de células endoteliais ou processo inflamatório local (LEE; JOO; JEON, 2020)

A oxaliplatina também se acopla e forma aductos com o DNA mitocondrial (mDNA). Esses aductos são considerados o mecanismo mais provável de necrose das células nervosas sensoriais (KANAT, ERTAS, CANER, 2017). A formação destes podem alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial ao afetar proteínas presentes nos canais seletivos de ânions dependentes de voltagem (ZHENG; XIAO; BENNETT, 2011; XIAO; XIAO; BENNETT, 2012; ZHENG; BENNETT, 2012).

Esses aductos também pode causar danos ao mDNA, como este não pode ser reparado, pois não expressam sistemas de reparo (reparo de excisão de base, vias de reparo de excisão de nucleotídeo) (CANTA et al., 2015), ocorre prejuízo na sua replicação e transcrição, levando à alteração da síntese proteica mitocondrial e conseqüentemente a erros na funcionalidade da cadeia respiratória (XIAO; ZHENG; BENNETT, 2012; XIAO; BENNETT, 2012; CANTA et al., 2015). Além de diminuições ou déficit significativos taxa de respiração estimulada pelo complexo I e pelo complexo II, seguido de uma diminuição ou redução da bioenergética mitocondrial, por déficits de produção de trifosfato de adenosina (ATP) (ZHENG; XIAO; BENNETT, 2011; XIAO; ZHENG; BENNETT, 2012; XIAO; BENNETT, 2012; ARETI et al., 2014), com conseqüente falha de energia e estresse oxidativo (XIAO; BENNETT, 2012; TRECARCHI; FLATTERS, 2019).

Estes danos podem levar à abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial, contribuindo na morte celular (CALLS et al., 2020). Além do aumento nos níveis das proteínas caspase-3 e PARP1 (fatores eficazes nas vias apoptóticas) e redução da razão Bcl-2/Bax (uma chave reguladora do interruptor apoptótico), provocado pela oxaliplatina, que contribui ainda mais para morte celular (MASSICOT et al., 2013; WASEEM; PARVEZ, 2016).

Podem ocorrer também alterações morfológicas, atrofia e disfunções mitocondriais (ALCINDOR; BEAUGER, 2011; XIAO; BENNETT, 2012; TRECARICHI; FLATTERS, 2019). Como 95% das mitocôndrias do sistema nervoso periférico se localizam nos axônios, as disfunções mitocondriais levariam à deficiência bioenergética crônica dos neurônios, resultando em descarga espontânea e anormal e degenerações dos neurônios aferentes dos GRDs. Alguns estudos até sugerem a hipótese da mitotoxicidade como principal alvo potencial isolado ou decorrente do estresse oxidativo celular (XIAO; BENNETT, 2012; BENNETT; DOYLE; SALVEMINI, 2014; TRECARICHI; FLATTERS, 2019). Os canais OCTN1 e OCTN2 localizados nas membranas plasmáticas e nas mitocôndrias e expressos em todos os tipos de neurônios GRD, podem estar envolvidos nessa mitotoxicidade, tendo em vista que esses canais transportam oxaliplatina e estão envolvidos na neurotoxicidade. (JONG et al., 2011; NISHIDA et al., 2018; WEI, et al., 2021).

O comprometimento ou disfunção da estrutura e função fisiológica mitocondrial, promove aumento da produção de radicais livres, estresse oxidativo (TRECARICHI; FLATTERS, 2019; ZAJACZKOWSKA et al., 2019) (esse estresse oxidativo somada à disfunção mitocondrial associada são causas importantes para o desenvolvimento e manutenção da neuropatia (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017; TRECARICHI; FLATTERS, 2019)), promove depleção de agentes antioxidantes, danos moleculares, desmielinização, neuroinflamação e alterações ou danos de enzimas, proteínas e lipídios (XIAO; BENNETT, 2012; ARETI et al., 2014; YANG et al., 2018) que, por conseguinte, provoca alterações estruturais em nervos periféricos (ZAJACZKOWSKA et al., 2019).

A própria oxaliplatina também induz estresse oxidativo mitocondrial no sistema nervoso (medula e DRG) que leva a uma resposta antioxidante mitocondrial prejudicada (JANES et al., 2013; FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017). Isso é provocada devido a oxaliplatina ocasionar redução de enzimas antioxidantes, como malondialdeído, glutatona e superóxido dismutase, bloqueio de enzimas mitocondriais, como citrato sintase e ATP sintase, e elevação na produção de ânion superóxido, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e de DNA nos neurônios dos DRGs e da medula (DI CESARE et al., 2012, 2013b; CORIAT et al., 2014).

Esse estresse oxidativo mitocondrial da oxaliplatina causa danos adicionais às mitocôndrias, pelo qual amplifica a produção de ROS e ativa processos patológicos decorrentes do estresse oxidativo (ARETI et al., 2014), eleva as concentrações de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (TOYAMA et al., 2014; FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017) e aumenta a produção de mediadores pró-inflamatórios (BULUA et

al., 2011). Esse aumento adicional e acentuado de ROS também provoca desmielinização, ruptura do citoesqueleto, sensibilização de processos de transdução de sinal (ZHENG; XIAO; BENNETT, 2011), bem como disfunção de células neuronais e não neuronais (gliais) ativação de vias apoptóticas ou morte celular induzida por caspases, proteínas quinases ativadas por mitogênio e proteína quinase C (CAROZZI et al., 2015).

Diante de condições de estresse oxidativo acentuado, pode ocorrer o aumento da biossíntese intracelular de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Condição essa, mostrada através do aumento da expressão de iNOS no corno dorsal da medula espinhal (AZEVEDO et al., 2013) e em neurônios de gânglios da raiz dorsal de camundongos (PEREIRA et al., 2018) que receberam injeções cumulativas de oxaliplatina.

Outro mecanismo bastante importante na neuropatia associada a oxaliplatina é a participação dos Receptores de Potencial Transiente (TRP's). Esses receptores, no qual são canais catiônicos não seletivos e expressos nos neurônios sensoriais, ao serem desregulados (SITTL et al., 2012; CAROZZI et al., 2015; MARMIROLI et al., 2015; NAKAGAWA; KANEKO, 2017) desempenham papel na patogênese da neuropatia aguda, pois suas atividades e expressões se elevam após a administração da oxaliplatina (MARMIROLI et al., 2015; CHUKYO et al., 2018) além de aumentar a excitabilidade dos neurônios sensoriais (DESCOEUR et al., 2011).

Além dos efeitos agudos nos neurônios sensoriais primários, funcionando como nociceptores (NAKAGAWA; KANEKO, 2017). Esses canais podem ter participação importante na neuropatia crônica induzida pela oxaliplatina, considerando seus altos níveis de expressão nos neurônios sensoriais dos gânglios da raiz dorsal (NASSINI et al., 2011; KAWASHIRI et al., 2018; MIZUNO et al., 2014; KATO et al., 2014; PARK et al., 2015; NAZIROĞLU; BRAIDY, 2017; CHUKYO et al., 2018), suas permeabilidades ao Ca^{2+} (íon importante no desenvolvimento e manutenção da neuropatia), suas sensibilidades ao estresse oxidativo (NAZIROĞLU; BRAIDY, 2017) e suas participações no decorrer da inflamação e do dano dos nervos periféricos (CHUKYO et al., 2018).

Ultimamente, uma atenção maior foi dada no possível papel desses canais expressos em vias nociceptoras, no qual foi explorado como um dos principais canais envolvidos na transdução de estímulos nocivos provocado pela oxaliplatina (MARMIROLI et al., 2015; CALLS et al., 2020)

Os canais TRPA1 (Receptores de Potencial Transiente Anquirina 1) e TRPM8 (Receptores de Potencial Transiente Melastatina 8) são os receptores mais envolvidos na fisiopatologia da neuropatia associada a oxaliplatina (ANAND et al., 2010; DESCOEUR et

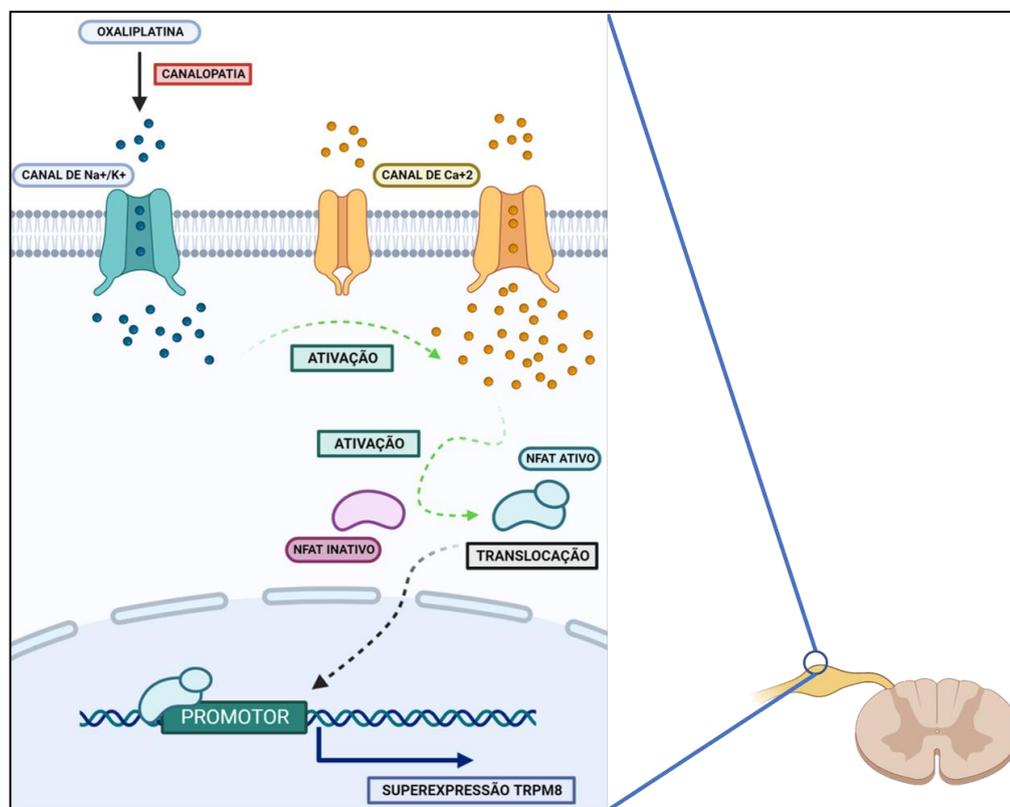
al., 2011; ZHAO et al., 2012) e presente nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) após seu uso (ZHAO et al., 2012). Esses canais são relatados como nociceptores do frio ou sensíveis ao frio e tem mostrado mediar toda hipersensibilidade induzida por oxaliplatina, que induz esse efeito peculiar de início rápido dentro de horas após sua infusão (DESCOEUR et al., 2011; NAKAGAWA; KANEKO, 2017).

O envolvimento de TRPM8 nessa neuropatia pode estar presente na administração única ou repetida de oxaliplatina. Foi evidenciado sua participação através do aumento na expressão desse transportador (DESCOEUR et al., 2011; KAWASHIRI et al., 2012; KATO et al., 2014; MIZUNO et al., 2014; RIMOLA et al., 2021) em fibras de médio porte em neurônios de DRG em camundongos com hiperalgesia ao frio (KAWASHIRI et al., 2012) (FIGURA 5).

Foi visto que a oxaliplatina aumenta os níveis de expressão de mRNA de TRPM8 após sua administração no DRG (DESCOEUR et al., 2011; KAWASHIRI et al., 2012; KATO et al., 2014; MIZUNO et al., 2014) mediado pela translocação nuclear do NFAT (Fator Nuclear de Células T Ativadas). Isso ocorre quando a oxaliplatina bem como o seu metabólito, oxalato, provocam disfunções nos canais de Na^+ e de K^+ ocasionando uma alteração no potencial de membrana. A partir disso, os canais de Ca^{+2} , principalmente o tipo L, são ativados, havendo o influxo desse íon. O aumento do Ca^{+2} intracelular induz a ativação do fator nuclear de Células T Ativadas (NFAT), o qual será translocado até o núcleo, interagindo com seu promotor, aumentando a expressão gênica do RNAm TRPM8 (FIGURA 3). A superexpressão desse transportador está associado ao desenvolvimento da hipersensibilidade ao frio (KAWASHIRI et al., 2012) (FIGURA 5).

A oxaliplatina aumenta comportamentos nociceptivos evocados por estimulação TRPM8 em roedores durante seu uso (USHIO et al., 2012; KATO et al., 2014; MIZUNO et al., 2014). Sugere-se, portanto, que o TRPM8 esteja envolvido na neuropatia aguda, subaguda e crônica causada pela oxaliplatina (NAKAGAWA; KANEKO, 2017).

Figura 5 – Mecanismo molecular e superexpressão do TRPM8 subjacente à hipersensibilidade ao frio na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina.



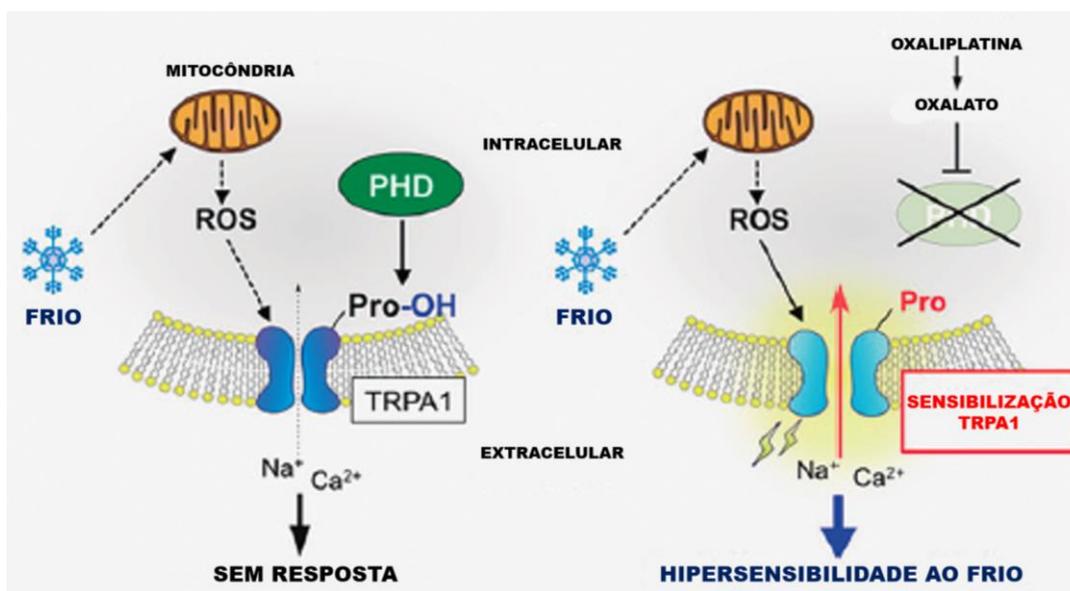
Fonte: adaptada de Kawashiri et al. (2012). A figura representa o mecanismo molecular e a superexpressão via Ca²⁺ tipos L/NFAT do TRPM8 subjacente à hipersensibilidade ao frio na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina. TRPM8: Receptores de Potencial Transiente Melastatina 8; NFAT: Fator Nuclear de Células T Ativadas.

Foi visto que a oxaliplatina aumenta o número, a capacidade de resposta, a responsividade dos receptores TRPA1 e a sensibilização das células neuronais aos agonistas TRPA1, porém não aumenta o número de células que expressam TRPA1 (ZHAO et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2015). A sensibilização de TRPA1 pode acontecer devido ao aumento de translocação desses receptores para a membrana através da via de sinalização de fosfolipase C (PLC) e proteína quinase A (PKA) verificada pela ocorrência rápida e aumentada na responsividade de TRPA1, ou pelo aumento de mRNA para TRPA1 nos gânglios sensoriais (ZHAO et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2015).

A sensibilização de TRPA1, também pode ser devido a uma redução do pH intracelular (acidificação do citosol) dos neurônios dos gânglios da raiz dorsal decorrente da concentração de oxaliplatina intracelular similar ao plasma (MIYAKE et al., 2017; RIVA et al., 2018) e que essa acidificação leva a formação de aductos com hemoglobina neuronal (responsável por tamponar prótons) (POTENZIERI et al., 2020).

Outra via de sensibilização de TRPA1, é a partir das espécies reativas de oxigênio (ROS), pois esses canais são altamente sensíveis a redox (MIYAKE et al., 2017; NAKAGAWA; KANEKO, 2017). A oxaliplatina ou um de seus metabólitos, oxalato (que possui grupos funcionais, 1-carboxilato e 2-oxo, são co-substratos comuns de prolil hidroxilases - PHD), inibe a atividade da PHD e esta causa a hidroxilação de um resíduo de prolina N-terminal de TRPA1 (Pro³⁹⁴ em TRPA1 humano) que torna o canal seletivo aos íons Na⁺ e Ca²⁺. Essa inibição de PHD induz a sensibilização de TRPA1 pelas ROS. Essa sensibilidade aprimorada permite que o TRPA1 detecte o frio evocadas pelas ROS, o que causa hipersensibilidade aguda ao frio, como também a hipersensibilidade crônica, e pode levar a compreensão da progressão e dos mecanismos na crônica (NAKAGAWA; KANEKO, 2017) (FIGURA 6).

Figura 6 – Mecanismo molecular do TRPA1 subjacente à hipersensibilidade ao frio na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina.



Fonte: adaptada de Nakagawa; Kaneko (2017). A figura representa o mecanismo molecular do TRPA1 subjacente à hipersensibilidade ao frio na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina. ATP: Adenosina trifosfato; OXL: Oxaliplatina; PHD: prolil hidroxilases; ROS: Espécies reativas de oxigênio; TRPA1: Receptores de potencial transiente anquirina 1;

Foi visto que a oxaliplatina aumenta isoladamente a responsividade da estimulação de TRPA1, mas não aumenta a responsividade do TRPV1 e do TRPM8 nos neurônios ganglionares da raiz dorsal de camundongos. Esses mesmos efeitos são provocados pelo oxalato (NAKAGAWA; KANEKO, 2017). Porém, quanto ao número desses tipos de receptores, há um aumento nivelado em neurônios sensoriais do DRG de camundongos e

ratos tratado agudamente (NASSINI et al., 2011; KAWASHIRI et al., 2018; MIZUNO et al., 2014; KATO et al., 2014; PARK et al., 2015; CHUKYO et al., 2018).

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que os canais TRPA1 e TRPM8 podem mediar ou ser mediados pelo estresse oxidativo mitocondrial, inflamação, além da própria alodinia ao frio e hiperalgesia induzida pela oxaliplatina (NASSINI et al., 2011).

Os canais TRPV1, apesar de apresentar na literatura pouco envolvimento, também são responsáveis pela hiperalgesia térmica e alodinia mecânica em neurônios sensoriais induzida por oxaliplatina (CHEN et al., 2015). Esses canais são sensibilizados pela oxaliplatina e co-mediados pelos receptores G2A acoplado à proteína G que são aumentadas no nervo ciático e nos gânglios da raiz dorsal (HOHMANN et al., 2017).

Os canais TRPV1, também geralmente são co-localizados com os canais TRPA1 mediando e participando da hipersensibilidade ao frio (NASSINI et al., 2011; ZHAO et al., 2012; TREVISAN et al., 2013; NAKAGAWA; KANEKO, 2017). Os canais TRPV1, podem estar co-localizados também com os receptores ativado por proteinase 2 (PAR2) no corno dorsal espinhal, que por sua vez, ambos estão aumentados, e a expressão de TRPV1 depende de PAR2. Ambos os receptores, quando ativados, promovem liberações de substância P e CGRP no corno dorsal superficial da medula espinhal, contribuindo na transmissão nociceptiva da hiperalgesia térmica e alodínia mecânica. (CHEN et al., 2015)

Essa co-localização e co-mediação desses dois canais (NASSINI et al., 2011; TREVISAN et al., 2013; NAKAGAWA; KANEKO, 2017) pode sofrer ativação pelos macrófagos/monócitos e pela geração de estresse oxidativo decorrentes da ação da oxaliplatina (TREVISAN et al., 2016). Esses canais também coparticipam na hipersensibilidade ao frio e desenvolvimento da neuropatia crônica observada em pacientes e em vários estudos não clínicos (NASSINI et al., 2011; ZHAO et al., 2012; TREVISAN et al., 2013; NAKAGAWA; KANEKO, 2017).

Como outro mecanismo da oxaliplatina na neuropatia, temos o desencadeamento de eventos neuroinflamatórios diretos, correlacionados ou independentes do estresse oxidativo, (MAKKER et al., 2017), no qual provoca aumento consistente da secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β e IL-6) e regulação negativa das citocinas antiinflamatórias (IL-10 e IL-4) em células da glia espinais e em gânglios da raiz dorsal (DRGs) (BURAKGAZI et al., 2011; WANG et al., 2017; XU et al., 2018; BRANDOLINI et al., 2019). Essa ação causa sensibilização periférica e central de neurônios nociceptivos (JAGGI; SINGH, 2012; LEES et al., 2017) bem como ativação sistêmica de células imunes (MAKKER et al., 2017).

A ativação de células imunes, assim como alterações e morte celular por necrose, pode secretar o HMGB1 (proteína de alta mobilidade do grupo caixa 1) supondo ser por mecanismos similares ao que ocorre nas células tumorais (por interação também com TLR4). (TESNIERE et al., 2010) Tendo em vista, que o TLR4 parece estar envolvido na neuropatia provocada pela oxaliplatina (TSUBOTA et al., 2019) e que não é dependente dos macrófagos, o que sugere ser liberado pelas próprias células neuronais ou das células de Schwann (SEKIGUCHI, KAWABATA, 2020).

O HMGB1 secretado no meio extracelular pode atuar como uma proteína de padrão molecular associado a danos (DAMP) por meio da ativação de vários receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), incluindo receptores Toll-like (TLR2, TLR4, TLR5), levando à aceleração da inflamação e da dor pelas reações e ativação de componentes inflamatórios e/ou da sinalização neuropática em animais (SEKIGUCHI, KAWABATA, 2020; TSUBOTA et al., 2019; NISHIDA et al., 2016)

Muitos dos mecanismos causais descritos e supracitados da neuropatia crônica induzida por oxaliplatina ocorrem simultaneamente e/ou podem se reforçar mutuamente (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017; SALAT, 2020).

2.1.4 Tratamento preventivo e terapêutica da neuropatia periférica induzida por oxaliplatina

Os dados mais recentes da literatura sugerem claramente que, embora várias terapias preventivas-profiláticas tenham sido testadas quanto ao seu potencial para amenizar ou aliviar a neuropatia induzida por oxaliplatina, essa condição clínica ainda não é considerada evitável (STAROBOVA; VETTER, 2017; BEIJERS et al., 2020).

Muitos dos agentes testados foram considerados ineficazes, porque não há algoritmos com embasamento científico de alta qualidade e com forte evidência para prevenção dessa neuropatia e muitos desses agentes ainda têm seus efeitos controversos (SALAT, 2020). Portanto, no momento, nenhum medicamento pode ser nomeado como padrão-ouro para prevenção da neuropatia periférica induzida por oxaliplatina (HERSHMAN et al., 2014; KARLSSON; ANDERSSON; JYNGE, 2017; SALAT, 2020; IBRAHIM; EHRLICH, 2020).

Porém, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (American Society of Clinical Oncology (ASCO)) faz algumas recomendações baseada em estudos de meta-análises, mesmo sem tanta evidência, para a prevenção da neuropatia induzida por oxaliplatina (Quadro 1). A ASCO recomenda também como prevenção a redução ou o término precoce do agente

agressor antes do desenvolvimento de sintomas incapacitantes (HERSHMAN et al., 2014). Como medida de prevenção também, tem a identificação de pacientes em risco para maximizar o benefício terapêutico e minimizar a neurotoxicidade (PULVERS; MARX, 2017).

Quadro 1 – Recomendação para prevenção da neuropatia periférica induzida por oxaliplatina da Sociedade Americana de Oncologia Clínica.

Força da recomendação	Medicamento
Recomendação fraca	Acetil-l-carnitina, dietilditiocarbamato (DDTC), nimodipina, BIA 10-2474
Recomendação moderada	Amifostina, amitriptilina, infusões de cálcio e magnésio, glutathione, Org-2766 (análogo do ACTH), pregabalina, ácido retinóico, emflermina, vitamina E
Dados inconclusivos: equilíbrio de benefícios e danos	Acetilcisteína, ácido alfa-lipóico, carbamazepina, oxcarbazepina, glutamato, glutamina, goshajinkigan, neurotropina, ômega-3, venlafaxina, vitaminas do complexo B
Recomendação moderada	Duloxetina
Recomendação forte	Nenhuma

Fonte: Adaptada de SALAT, 2020; HERSHMAN et al., 2014; LOPRINZI et al., 2020

Assim, de acordo com a diretriz de prática clínica da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) de 2014 (HERSHMAN et al., 2014), como a atualizada de 2020, nenhum agente ainda não foi recomendado para prevenir a neuropatia periférica induzida por oxaliplatina e apenas a duloxetina pode ser usada como tratamento para neuropatia (SMITH et al., 2013; HERSHMAN et al., 2014; LOPRINZI et al., 2020)

No que diz respeito à gestão terapêutica da neuropatia, tanto a forma aguda como a crônica, as recomendações incluem educação do paciente (NAGASHIMA et al., 2014), boa comunicação médico-paciente (IBRAHIM; EHRLICH, 2020), ligações mais estreitas entre as equipes clínicas de oncologia (para garantir que os pacientes tenham reconhecimento imediato dos sintomas progressivos e sejam monitorados de forma eficaz para gerenciamento da dor) (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017), encaminhamento para fisioterapia e medicina de reabilitação (para avaliação precoce de déficits funcionais e risco de quedas)(STAFF et al., 2019), modificação no manejo das doses (abordagem "stop and go", tempo de infusões prolongadas, atraso, redução e/ou cessação das doses) (STOREY et al., 2010; NAGASHIMA et al., 2014; KAWASHIRI et al., 2019; DROTT et al., 2019; SALAT, 2020) ou mudanças para agentes quimioterápicos menos eficazes (o que pode comprometer o tratamento antineoplásico) (STAROBOVA; VETTER, 2017) e o tratamento farmacológico (NAGASHIMA et al., 2014).

O tratamento farmacológico é pautado apenas administração de agentes neuromoduladores, como: anticonvulsivantes (gabapentina, pregabalina, carbamazepina,

lamotrigina, oxcarbazepina, topiramato), antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (venlafaxina, duloxetine) (LOPRINZI et al., 2014; SISIGNANO et al., 2014; STAROBOVA; VETTER, 2017; KANAT; ERTAS; CANER, 2017; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; CAVALETTI; MARMIROLI, 2020), antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, nortriptilina) (STAROBOVA; VETTER, 2017), opioides (tramadol, morfina, oxicodona) (NAGASHIMA et al., 2014; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020), bloqueador dos canais de cálcio (TATSUSHIMA et al., 2013), adesivo/creme de lidocaína, lorcaserina, TRK-750 (BOYETTE-DAVIS et al., 2018; CAVALETTI; MARMIROLI, 2020), cetamina, com ou sem baclofeno (BAK) (STAFF et al. 2019) e mexiletina (DEUIS et al., 2014; ZHAO et al., 2014).

E na administração de outros agentes, como: infusão iônica de cálcio e magnésio (NAGASHIMA et al., 2014; SISIGNANO et al., 2014), amifostina (STAFF et al. 2019; KANG et al., 2020), Dietilditio-carbamato (DDTC), Amitriptilina tópica (STAFF et al. 2019), riluzol, L-carnosina (CAVALETTI; MARMIROLI, 2020), inibidor de anidrase carbônica (KANG et al., 2020), calmagafodipir (GLIMELIUS et al., 2018; CANTA et al., 2020; CAVALETTI; MARMIROLI, 2020), caverdilol (ARETI; KOMIRISHETTY; KUMAR, 2017), Goshajinkigan (NISHIOKA et al., 2011), nutracêuticos/antioxidantes (vitamina E, ácido alfa-lipóico, glutathiona, glutamina, acetilcisteína e acetyl-L-carnitina, rutina e quercetina) (AZEVEDO et al., 2013; SISIGNANO et al., 2014; HERSHMAN et al., 2014; STAROBOVA; VETTER, 2017; KANAT; ERTAS; CANER, 2017; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; KAWASHIRI et al., 2021), além de antiinflamatórios não esteroidais (diclofenaco) (NAKAGAWA; KANEKO, 2017) e analgésicos comuns (ZHAO et al., 2014; STAROBOVA; VETTER, 2017).

Todas as medidas farmacológicas acima são pautadas principalmente com base em evidências de outras condições de dor neuropática crônica, em vez de ser direcionar especificamente para os mecanismos intrínsecos e subjacentes da neuropatia induzida por oxaliplatina (FINNERUP et al., 2015 FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017).

Diante disso, o tratamento farmacológico não tem alcançado bons resultados, tendo em vista que não existe medicamento totalmente direcionado a essa neurotoxicidade e ainda se mostram ineficazes na modulação do processo neuropático e na redução do próprio processo sintomatológico (parestesias, disestesias, alodínia, entre outros) (LOPRINZI et al., 2014; SISIGNANO et al., 2014; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020).

A pregabalina, por exemplo, foi segura durante as infusões de oxaliplatina, mas não diminuiu a incidência da neuropatia crônica e falhou em reduzir a neuropatia mostrando

nenhuma diferença significativa em comparação com placebo (ANDRADE et al., 2017), onde apenas diminui a sintomatologia (IBRAHIM; EHRLICH, 2020). A venlafaxina, não se mostrou eficaz para a prevenção e tratamento e sua análise falhou em demonstrar qualquer eficácia sobre a neuropatia induzida por oxaliplatina na clínica (ZIMMERMAN et al., 2016), na forma aguda por exemplo, tanto seus efeitos como de outros inibidores da recaptação da serotonina-noradrenalina (milnaciprano) tiveram seus efeitos inibitórios fracos (NAKAGAWA; KANEKO, 2017).

A carbamazepina, a oxcarbazepina, o glutamato, a glutamina, o goshajinkigan, o ácido alfa-lipóico, o ômega-3 e as vitaminas do complexo B não são recomendados como medicamentos de prevenção e tratamento da neuropatia por causa de seus dados inconclusivos e sem significância entre os grupos e devido baixo nível de evidência (STAROBOVA; VETTER, 2017; KAWASHIRI et al., 2021). O inibidor da amida hidrolase de ácido graxo (BIA 10-2474) teve seus estudos encerrados precocemente por causa dos eventos adversos graves (morte, complicações neurológicas graves) (SALAT, 2020) As abordagens com analgésicos comuns são frequentemente insatisfatórias na forma crônica (STAROBOVA; VETTER, 2017) e na forma aguda, apresentou em alguns casos uma sensibilidade incomum e em alguns casos tiveram maior eficácia do que os analgésicos de ação central (NAKAGAWA; KANEKO, 2017). Os anti-inflamatórios não esteroidais, como o diclofenaco, não têm efeito sobre a hipersensibilidade aguda ao frio (NAKAGAWA; KANEKO, 2017).

A duloxetina é a única droga aprovada com efeito significativo na prevenção e terapêutica da dor neuropática sem reduzir a atividade antitumoral da oxaliplatina, pois permite a inibição do processamento de estímulos dolorosos nos neurônios do corno espinhal dorsal (apesar que ainda carece de apoio de evidência suficiente), porém não muda o curso fisiopatológico da neuropatia (SMITH et al., 2013, 2017; HERSHMAN et al., 2014; MENG et al., 2019; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; CERESA; CAVALETTI, 2011) e suas reações adversas a medicamentos tornam o uso controverso (KANG et al., 2020).

Os antiepilépticos, como a gabapentina, não apresentaram eficácia significativa na configuração clínica crônica (LOPRINZI et al., 2014) e apenas tratou a sintomatologia (IBRAHIM; EHRLICH, 2020). Na forma aguda inibiu apenas a hipersensibilidade aguda ao frio (NAKAGAWA; KANEKO, 2017). Os analgésicos e os opioides foram parcialmente eficazes para reduzir os sintomas neuropáticos crônicos (IBRAHIM; EHRLICH, 2020) e na forma aguda seus efeitos inibitórios foram fracos (NAKAGAWA; KANEKO, 2017). Os antidepressivos e antioxidantes reduzem apenas o processo sintomatológico sem modular o curso clínico da neuropatia (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020). Os agentes antidepressivos,

incluindo, amitriptilina e lamotrigina, também não apresentaram eficácia significativa nessa condição clínica, tanto na crônica (LOPRINZI et al., 2014) como na aguda, onde não têm nem efeito sobre a hipersensibilidade aguda ao frio (NAKAGAWA; KANEKO, 2017).

As infusões de sais de cálcio e magnésio, na forma de gluconato de Ca^{2+} e sulfato de Mg^{2+} antes indicavam algum benefício na melhora da neuropatia aguda (GROTNEY et al., 2011; NAGASHIMA; et al., 2014), porém essa intervenção não foi totalmente confirmada (ALCINDOR; BEAUGER, 2011) e alguns estudos revelam que não funcionam como uma estratégia para prevenir ou tratar o desenvolvimento da neuropatia aguda e também não reduziu a neuropatia cumulativa/crônica (HAN et al., 2013; LOPRINZI et al. 2014; JORDAN et al., 2016). Os opioides, quanto aos seus efeitos protetores e terapêuticos na neuropatia induzida por oxaliplatina ainda não foi estabelecida. A oxicodona mostrou-se eficaz e tolerável para o tratamento da dor neuropática apenas para atenuar a gravidade da neuropatia e ampliar o uso da terapia FOLFOX (NAGASHIMA; et al., 2014)

Quanto à lidocaína, lorcaserina, TRK-750, riluzol, L-carnosina e calmagofodipir, apesar dos seus resultados bem promissores, os estudos mostram dados inconclusivos, com um tamanho da amostra na maioria dos estudos baixo e parece improvável que esses estudos possam eventualmente fornecer resultados confiáveis. Alguns desses compostos possuem apenas medidas de resultados primários, indicando uma primeira parte de ensaios abertos a serem posteriormente testados, alguns não se baseiam em fundamentos patogênicos e os métodos de avaliação são altamente variáveis (CAVALETTI; MARMIROLI, 2020). A minociclina, não demonstrou diferenças significativas em comparação com o grupo de controle (WANG et al., 2019b).

Outros fármacos como a cimetidina (inibidor OCT2), a dasatinibe (inibidor OCT2), a ergotionina (inibidor de OCTN1), a histidina de cobre (inibidor CTR1), embora tenham efeitos na prevenção da acumulação, melhora na neutotoxicidade e melhora nos sintomas neuropáticos, estes são apenas estudos não clínicos (*in vitro* e *in vivo*) e nenhum foi clinicamente reconhecido para tratar ou prevenir a neuropatia induzida por oxaliplatina.

Como a dor neuropática é muito difícil de aliviar, e o tratamento farmacológico não se mostra tão eficaz, algumas abordagens alternativas não farmacológicas estão sendo consideradas, como o uso de terapias antioxidantes naturais (etoxiquina, curcumina, etc.), práticas calmantes (atividade meditativa, acupuntura, massagem, etc.) (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020), vitaminas e suplementos (IBRAHIM; EHRLICH, 2020), terapias medicinais à base de ervas (*Acorus calamus*, espécies de *Cannabis*, *Matricaria*, *Camomila*, *Ginkgo biloba*, *Curcuma longa*, *Camellia sinensis*) (ZHANG et al., 2018; WU et al., 2019;

MAY et al., 2019), terapia com células-tronco mesenquimais (AL-MASSRI; AHMED; EL-ABHAR, 2019), utilização de probióticos e modificação da microbiota intestinal (CASTELLI et al., 2018), exercício ou atividade física (SALAT, 2020) com programa de caminhada progressiva e de resistência de intensidade moderada (KLECKNER et al., 2018), programa de treinamento de força e equilíbrio, estimulação magnética transcraniana repetitiva, mudanças na dieta (dieta pobre em poliaminas) e aplicação de Henna (CAVALETTI; MARMIROLI, 2020) e resfriamento regional (aplicação de gelo) (IBRAHIM; EHRLICH, 2020).

Esses ensaios não farmacológicos são, na grande maioria das situações, cogitados para obter alívio sintomático, em vez de prevenir ou tratar a neuropatia (HERSHMAN et al., 2014).

Diante do exposto acima, pode-se afirmar que não há atualmente nenhuma evidência válida ou recomendação conclusiva de tratamento totalmente eficaz para os compostos testados (HERSHMAN et al., 2014; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; SHIGEMATSU et al., 2020; SALAT, 2020; CAVALETTI; MARMIROLI, 2020; IBRAHIM; EHRLICH, 2020; LOPRINZI et al., 2020). De fato, as estratégias terapêuticas atuais, apenas minimizam a gravidade dos sintomas dolorosos (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020), inclusive a própria duloxetina, que é o único fármaco recomendado atualmente como tratamento para essa neuropatia, (HERSHMAN et al., 2014; LOPRINZI et al., 2020)

Embora muitas pesquisas já tenham sido realizadas para prevenir ou tratar (SHIGEMATSU et al., 2020), para diminuir a taxa de desenvolvimento e a gravidade da neuropatia (IBRAHIM; EHRLICH, 2020), bem como para melhorar o controle dos sintomas neuropáticos, a busca por agentes/compostos que atuem sobre essa neuropatia, ainda é considerado um objetivo terapêutico crucial a ser alcançado (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; SHIGEMATSU et al., 2020). Uma vez que essa neuropatia não é evitável e nem tratável com os medicamentos disponíveis atualmente (NAKAGAWA; KANEKO, 2017; SALAT, 2020; IBRAHIM; EHRLICH, 2020), a oportunidade de identificar tratamentos preventivos, adjuvantes ou terapêuticos seguros torna-se apropriada (DI CESARE et al., 2017a).

No entanto, há uma forte demanda médica na procura de novas opções terapêuticas (SALAT, 2020), principalmente no que diz respeito a terapias baseadas em mecanismos de iniciação ou prevenção (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; SHIGEMATSU et al., 2020) antes mesmo da primeira dose de oxaliplatina (GEBREMEDHN; SHORTLAND; MAHNS, 2018).

Entretanto, para que isso ocorra, faz-se necessário a compreensão da complexidade dos mecanismos neurobiológicos de base ou subjacentes implicados no desenvolvimento e na sintomatologia da neuropatia, que é fundamental e estabelece uma base na tentativa de identificar alvos para se aplicar uma abordagem para os ensaios e pesquisas tanto na prevenção ou neuroproteção como no tratamento da neuropatia induzida por oxaliplatina (JAGGI; SINGH, 2012; SISIGNANO et al., 2014; HERSHMAN et al., 2014; NAKAGAWA; KANEKO, 2017; SALAT, 2020).

Como consequência, dezenas de modelos *in vitro* e *in vivo* de neuropatia induzida por oxaliplatina foram desenvolvidos para elucidar esses possíveis mecanismos moleculares envolvidos no seu desenvolvimento e encontrar alvos neuroprotetores (CALLS et al., 2020). Porém a pesquisa em animais é uma forte demanda científica e prática, no qual possibilita a facilidade os estudos e da descoberta e desenvolvimento de mecanismos e novas intervenções terapêuticas, (SISIGNANO et al., 2014). Alguns modelos animais já indicaram que o direcionamento de receptores expressos nas vias da dor pode ser uma abordagem farmacológica importante para medicamentos de prevenção e tratamento da neuropatia induzida por oxaliplatina (SALAT, 2020)

Nesse contexto, novos compostos químicos, estão sendo investigados nos estágios não clínicos e clínicos da pesquisa. (SALAT, 2020). Diante disso, um medicamento em descoberta e em desenvolvimento, tido como ideal para prevenir e/ou tratar a neuropatia induzida por oxaliplatina deve apresentar as seguintes características para ser clinicamente útil como um protetor de quimioterapia: atuar como um agente multialvo, pois isso pode elevar sua eficácia protetora e terapêutica; deve proteger seletivamente o tecido normal ou neuronal, mas não o tecido tumoral, ou seja, não deve diminuir a eficácia antitumoral da oxaliplatina; e aumentar sua eficácia na prevenção dos sintomas e causas da neuropatia (SALAT, 2020).

A estreita colaboração contínua entre a pesquisa clínica e pré-clínica é necessária para traduzir a melhor compreensão dos mecanismos subjacentes no desenvolvimento de novos tratamentos ou de estratégias eficazes de prevenção e tratamento para neuropatia induzida pela oxaliplatina (SIKANDAR; DICKENSON, 2013; FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017; DORSEY et al., 2019)

2.2 Proteína Transferidora de Lipídeos isolada das sementes de *Morinda citrifolia* - McLTP1

A McLTP1 é uma proteína transferidora de Lipídeos (LTP) vegetal, caracterizada como um peptídeo, solúvel em água e de caráter básico (CAMPOS et al., 2016), que é característica comum das LTPs vegetais (KADER, 1996). Assim como outras LTPs vegetais, que apresentam estruturas compactas estabilizadas por pontes dissulfeto, que as tornam proteínas extremamente estáveis e resistentes à desnaturação térmica e a digestão por proteases (LINDORFF-LARSEN; WINTHER, 2001; CAMPOS et al., 2016), a McLTP1, também apresenta essas mesmas características, tendo em vista que a mesma foi submetida a uma simulação de estabilidade térmica (80°C) e de digestão gástrica e intestinal *in vitro* demonstrando-se estável e resistente (CAMPOS et al., 2016).

Em outros estudos de estabilidade, a McLTP1, demonstrou manter suas atividades e propriedades biológicas ou farmacológicas (antinociceptiva), mesmo após três meses de armazenamento sob refrigeração. Além disso apresentou atividades inibitórias de tripsina em diferentes valores de pH e temperaturas, bem como da quimiotripsina, papaína e alfa-amilase (LUTIF, 2015).

A McLTP1 apresenta um rendimento de 6,12% da proteína solúvel bruta e possui uma massa molecular de 15,13 kDa, mostrada através de eletroforese (SDS-PAGE) (CAMPOS et al., 2016). Essa mesma massa molecular (15,13 kDa) foi observada em outras LTP1s sob as mesmas condições (KADER, 1996). Quando cromatografada em espectrometria de massa a McLTP1 apresenta uma massa molecular de 10,09 kDa (CAMPOS et al., 2016), estando de acordo com as massas moleculares aproximadas das subfamílias das LTP1s (9kDa) (KADER, 1996).

Os primeiros 33 aminoácidos da sequência N-terminal e os quatro dos oito resíduos de cisteína da McLTP1 mostram semelhanças com outras LTPs isoladas da mesma família (Rubiaceae), no qual apresenta 57% de identidade com as LTP1s desta família. Diante desses critérios, foi possível classificá-la como membro da subfamília LTP1 (CAMPOS; et al., 2016). A McLTP1 possui número de acesso e registro C0HJH5 na UniProtKB (Consórcio UniProt© 2002-2022, uma base de dados de sequências de proteínas e as suas funcionalidades) (SOUZA et al., 2018).

Estudos topográficos apresentados pela McLTP1, através da microscopia de força atômica, revela que se associa às outras LTP1 formando canais centrais com diâmetros de cerca de 4,4 nm e a imagem tridimensional revelou o padrão de oligomerização. Estudos de

dicroísmo circular mostrou que a McLTP1 é caracterizada por espectros de mínimo e máximo de elipticidade molar entre 208 e 222 nm e um máximo positivo de 195 nm e possui um total de 26% de α -hélice. E mesmo com aquecimento a 95°C e com diferentes pH e micelas, não gerou mudanças significativas no espectro do dicroísmo circular da proteína o que corrobora com a alta resistência da proteína a desnaturação, calor e proteases (LUTIF, 2015).

A presença de dois picos com valores de razão m/z de 9,450 e 9,466 na espectrometria de massas em condições nativas, pode indicar a existência de isoformas de McLTP1. Essa possível existência de isoformas da McLTP1, pode ser suspeitada devido ao fato das LTPs formarem dímeros nos tecidos das plantas, codificados por famílias multigênicas (comum nas LTPs), gerando isoformas (GORJANOVIC et al., 2005). Porém, não há informações sobre a presença de suas isoformas em sementes de *M. citrifolia* L. (CAMPOS, et al., 2016).

Em estudos de propriedades espectroscópicas da McLTP1 em interação com micelas, na perspectiva de compreender a interação com as membranas biológicas, foi visto que a McLTP1 (por possuir natureza catiônica) não provocou mudanças em micelas catiônicas (CTAB) e zwitteriônicas (HPS) por repulsa eletrostática, porém interagiu com micelas aniônicas (SDS) (LUTIF, 2015).

Em outros estudos *in vitro*, a McLTP1 também demonstrou atividade citotóxica em linhagem de células de câncer de ovário (Ovcar-8) e atividade hemolítica (LUTIF, 2015).

A McLTP1 também demonstrou efeito antibacteriano contra espécies de interesse clínico em modelos *in vitro*, no qual inibiu o crescimento de bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus* spp., foi capaz de diminuir a formação de biofilme de *S. aureus* e demonstrou um efeito sinérgico com oxacilina contra *S. aureus* e *S. epidermidis* (SOUZA et al., 2018).

Outra atividade biológica da McLTP1 foi sobre patógenos fúngicos, no qual inibiu significativamente o crescimento de fungos da espécie *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus gatti* e *Cryptococcus neoformans*. Em sinergismo com a anfotericina B (droga antifúngica) diminui os valores da IC100% pela metade para alguns fungos testados (SOUZA, et al., 2015; SOUZA, 2016). Esse tipo de atividade é comum em inúmeras LTPs que apresentam atividades antimicrobianas *in vitro* significativas e relevantes contra algumas espécies fúngicas, inclusive contra espécies de interesse clínico (OOI et al., 2006; DIZ et al., 2011; ZOTTICH et al., 2011; NG et al., 2012; LI et al., 2021).

Em estudos não clínicos *in vivo* foram realizados testes de biodisponibilidade e acompanhamento do efeito farmacológico. No teste de biodisponibilidade, foi realizado imunodeteção de McLTP1 no plasma de camundongos após administração oral de 8mg/kg, para verificar a quantidade de McLTP1 presente na circulação sistêmica após sua

administração, mostrando que após duas horas de administração há um pico de concentração circulante. A McLTP1 foi imunodetectada após 12 horas da administração de McLTP1. Paralelo a este teste, no acompanhamento do efeito farmacológico, mostra que o efeito antinociceptivo da proteína é diminuído com o passar do tempo, entretanto, após 2 horas de administração, foi observado o efeito mais potente McLTP1 chegando a inibir em 85,71% o número das contorções abdominais. Após 10 horas foi observada perda de 50% do efeito da McLTP1, após 12 horas, ainda foi observado efeito antinociceptivo de 33,33% e após 24 horas da administração, ocorreu completa metabolização de McLTP1 (COSTA, 2016).

Em estudos pré-clínicos *in vivo* de toxicidade, a McLTP1 demonstrou não provocar mortalidade, nem alterações alérgicas, comportamentais, hematológicas e bioquímicas em camundongos (COSTA, 2016).

Em outros estudos *in vivo*, a McLTP1 também demonstrou outras atividades biológicas e farmacológicas. Dentre elas, a atividade antinociceptiva, no qual quando administrada oral ou intraperitonealmente em camundongos reduziu significativa e de forma dose-dependente a nocicepção aguda. Essa atividade não foi alterada mesmo após a incubação da McLTP1 a altas temperaturas (80°C/60 min) não houve perda do efeito e uma boa estabilidade térmica da proteína. Esse efeito demonstrou-se significativo tanto na fase da nocicepção neurogênica como na nocicepção inflamatória (no teste de formalina), podendo ter envolvimento dos receptores opioides com ação central e periférica, sem quaisquer perturbações no sistema nervoso central como comprometimento da coordenação motora ou sedação, que pode ser mal interpretada como atividade antinociceptiva (CAMPOS; et al., 2016).

Outros possíveis mecanismos ou vias de ação da McLTP1 na atividade antinociceptiva, foi observada a partir do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, sugerindo, que sua ação pode envolver também a participação da via NO/cGMP, via K⁺/PKG/ATP e receptores TRPV1, onde fármacos antagonista e bloqueadores/inibidores (L-NAME, glibenclamida, capsazepina) reverteram de forma significativa o efeito antinociceptivo da McLTP1 (CAMPOS, et al., 2013).

Quanto ao efeito anti-inflamatório, a McLTP1 após administração oral e intraperitoneal, reduziu significativamente o edema de pata causado por dextrana e carragenina (nas duas fases inflamatórias), a migração de leucócitos totais em especial neutrófilos para as patas e a cavidade peritoneal em processos inflamatórios induzidos por carragenina, reduziu a hipernocicepção (avaliada por meio do teste de Von Frey eletrônico) e promoveu uma redução significativa do TNF-alfa, IL-1 β e IL-6 (citocinas pró-inflamatórias) e

aumentou os níveis da IL-10 (citocina anti-inflamatória) nos coxins plantares dos animais com inflamação induzida por carragenina. A McLTP1 ainda mostrou ação antipirética, no qual diminuiu significativamente a temperatura retal dos camundongos (LIMA; et al., 2016; CAMPOS et al., 2017).

A McLTP1 também demonstrou efeito anti-inflamatório por via intravenosa, no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano, no qual a McLTP1 preveniu de maneira significativa o dano intestinal, reduziu a sobrecontratilidade do músculo intestinal, diminuiu os níveis de MPO, IL-1 β , IL-6 e KC (IL-8), reduziu a expressão de COX-2, NF- κ B e iNOS e diminuiu a mortalidade e a diarreia em camundongos (DO CARMO, et al., 2022).

A McLTP1 também apresentou ação antiinflamatória por via intraperitoneal ou oral em um modelo murino de pancreatite induzida por ceruleína, no qual reduziu significativamente o edema e a inflamação, os níveis elevados de amilase e lipase séricas, a atividade da MPO, protegeu os pâncreas de danos histológicos e preveniu de forma indireta a lesão tecidual pulmomar por redução da inflamação e dano pancreático (CAMPOS et al., 2017).

A McLTP1 apresenta efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório com ações similares em ambas às vias de administração oral e intraperitoneal (LIMA; et al., 2016; CAMPOS et al., 2017).

Outra atividade da McLTP1, é a ação gastroprotetora que parece estar relacionado à ativação da via do óxido nítrico (NO) e sua capacidade de reduzir a secreção gástrica, reduzir os níveis de malondialdeído (MDA) e de aumentar os níveis de glutathiona reduzida (GSH) reduzindo o estresse oxidativo (NOGUEIRA et al., 2022). E a ação hepatoprotetora, que por sua vez, mostrou reduzir as alterações histológicas na lesão hepática induzida por paracetamol, reduzir os níveis de AST e ALT, reduzir os níveis de MDA e de aumentar os níveis de GSH reduzindo o estresse oxidativo (NOGUEIRA, 2018).

A McLTP1 também mostrou ter efeito nefroprotetor na nefrotoxicidade induzida pela administração de gentamicina, no qual foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de creatinina, proteinúria e nos níveis séricos de ureia (RIBEIRO et al., 2016; MARINHO et al., 2020). protegeu as células contra a citotoxicidade da gentamicina, aliviou o estresse oxidativo e a inflamação, promoveu redução na atividade da MPO e modulação de citocinas, e melhora nas alterações histológicas (MARINHO et al., 2020).

O tratamento com McLTP1 mostrou ter efeito uroprotetor, no modelo de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida, no qual reduziu o peso úmido da bexiga, observou-se uma redução dos parâmetros de toxicidade (edema macroscópico e hemorragia), reduziu a

atividade da MPO, foi capaz de promover redução da permeabilidade vascular e da hemoglobina na bexiga, atenuou escores inflamatórios e preservou a estrutura do urotélio. Na atividade anti-inflamatória promoveu diminuição significativa das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e aumento de IL-10; diminuiu a expressão de COX-2, NF-kB e F4/80, e expressão gênica de IL-33, IL-4 e iNOS. A McLTP1 também apresentou atividade antioxidante, reduzindo MDA e NO e aumentando os níveis de GSH, SOD e CAT (RANGEL et al., 2023).

A McLTP1 também apresentou efeito protetor em um modelo de sepse induzida por Ligadura e perfuração cecal (LPC) em camundongos. Quando administrados por via oral e intraperitoneal preveniu a letalidade frequentemente observada na sepse grave nos animais e foi capaz de regular negativamente as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-6 e MCP-1 (SOUZA et al., 2018).

Diante das ações e efeitos supracitados, podemos observar que a McLTP1, é um princípio ativo de natureza proteica, que exerce diversos efeitos sem provocar toxicidade em animais. Esse peptídeo, apresenta uma boa capacidade de atingir a circulação sistêmica sem sofrer alterações em sua estrutura, apresenta uma boa biodisponibilidade e promove seus efeitos biológicos, seja por via oral ou intraperitoneal, o que faz essa molécula ser diferenciada no meio das outras proteínas vegetais.

Diante disso, a McLTP1, mostrou exercer diversos efeitos biológicos, como sua capacidade de modificar o processo inflamatório modulando citocinas pro-inflamatórias, anti-inflamatórias e atuando sobre o MPO em vários modelos inflamatórios (edema de pata, mucosite intestinal, pancreatite, gastrite, lesão hepática, nefrotoxicidade, cistite e sepse); sua atividade antinociceptiva, que pode ser mediada por receptores opioides, via NO/cGMP, via K⁺/PKG/ATP ou receptores TRPV1; sua atividade moduladora do estresse oxidativo mediando alterações nos níveis de MDA e GSH (como vistos nos efeitos, gastroprotetor, hepatoprotetor e uroprotetor); sua ação sobre a reversão da toxicidade provocadas por alguns quimioterápicos (irinotecano, gentamicina, ifosfamida); e sua ação sobre células cancerígenas (Ovcar-8).

Diante desses efeitos, a McLTP1 torna-se uma molécula promissora para ser estudada como um agente protetor contra toxicidades provocadas por drogas, e mais precisamente para quimioterapia antineoplásica, tendo em vista, que os processos fisiopatológicos e sintomatológicos são prodrômicos e comuns nas toxicidades de vários agentes quimioterápicos.

3 JUSTIFICATIVA

A oxaliplatina é um agente antineoplásico usado no tratamento farmacológico do câncer colorretal metastático e adjuvante no câncer colorretal, bem como no tratamento de outros cânceres do trato digestivo, aumentando a expectativa de vida dos pacientes. Porém, apresenta como desvantagem uma toxicidade neurológica que provoca a neuropatia sensitiva periférica, e isso pode levar a uma redução na dosagem ou descontinuação do uso da oxaliplatina, o que pode provocar implicações na própria terapêutica do câncer. A presença sintomatológica desse efeito colateral nos pacientes causa um forte impacto físico, econômico e social. Apesar das hipóteses sugestivas, não há na literatura pertinentes estratégias preventivas e de tratamento farmacológico específico totalmente estabelecidas, o que torna um objetivo crucial ainda a ser alcançado.

Diante disso, na ausência de agentes eficazes, torna-se indispensável uma investigação aprofundada de novas alternativas preventivas/terapêuticas para essa neuropatia. Uma abordagem científica ao estudo de compostos ou moléculas naturais pode auxiliar na identificação de produtos capazes de reduzir esse efeito colateral.

A maioria das pesquisas exploram metabólitos e derivados naturais como agentes terapêuticos neuroprotetores. Estudar proteínas isoladas como princípio ativo natural pode apresentar benefícios maiores sobre outros compostos naturais, como interações de ligação mais específicas das proteínas, favorecendo uma redução de ações fora do alvo.

A McLTP1 tem demonstrado em estudos anteriores ser um princípio ativo de origem proteica com resultados promissores. Tais resultados embasam e sugerem que suas ações podem levar a resultados positivos sobre a neuropatia sensitiva induzida por oxaliplatina.

Como por exemplo, em estudos com modelos de toxicidade provocada por quimioterápicos, viu-se que a McLTP1 atuou como um forte agente protetor contra os efeitos tóxicos, o que podem sugerir também promover neuroproteção contra a neurotoxicidade da oxaliplatina. Em alguns estudos demonstrou atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e moduladoras do estresse oxidativo, no qual podem ter forte implicação na modulação dos processos fisiopatológicos (nocicepção, inflamação e estresse oxidativo) e sintomatológicos da neuropatia induzida por oxaliplatina. Em outro estudo demonstrou atividade contra células cancerígenas, que por sua vez, além de poder promover atividade neuroprotetora ainda pode contribuir na ação antineoplásica da oxaliplatina.

Além disso, a McLTP1 é segura, onde em teste de toxicidade, demonstrou sua segurança por via oral e intraperitoneal. É um peptídeo que apresenta uma boa capacidade de

atingir a circulação sistêmica com uma boa biodisponibilidade e não sofre alterações em sua estrutura mesmo após sua administração oral, o que torna essa molécula diferenciada no meio das outras proteínas vegetais. Essa segurança e sua administração por via oral mantendo seus efeitos biológicos, possibilita a vantagem em estudos futuros de tornar possível seu uso de forma acessível, cômoda e prática para os pacientes usarem entre os ciclos de quimioterapia com oxaliplatina, ao fazer uma correlação com a prática clínica.

Além disso, não foram identificados estudos que avaliassem o uso de proteínas isoladas de sementes de plantas e nem da McLTP1 nessa condição clínica tanto em modelos experimentais em animais como em humanos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar o efeito neuroprotetor de uma proteína isolada de sementes de *Morinda citrifolia* (McLTP1) sobre a neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos.

4.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito antinociceptivo da McLTP1 em camundongos com neuropatia sensitiva periférica induzida;
- Avaliar o efeito da McLTP1 sobre o comprometimento comportamental e motor provocados pela neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina;
- Investigar a participação de receptores TRPA1 e TRPM8 no efeito antinociceptivo da McLTP1;
- Estimar o efeito neuroprotetor do tratamento com a McLTP1 em camundongos com neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em nervos ciáticos;
- Verificar o efeito da McLTP1 sobre a expressão de c-Fos, ATF-3 e nitrotirosina em gânglios da raiz dorsal e medula espinal
- Avaliar a ação moduladora da McLTP1 sobre o estresse oxidativo associado a oxaliplatina na medula espinhal e nervos ciáticos;
- Investigar o efeito da McLTP1 sobre a leucopenia associada a oxaliplatina.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta, identificação e obtenção do material vegetal

Os frutos da espécie *Morinda citrifolia* L. (Noni) foram colhidos manualmente no estágio de maturação amarelo-claro a partir de plantas localizadas na cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil (3°44'24.1" S 38°34'36.2" W).

Uma amostra representativa de exsicata do material coletado é disponível para conferência no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Ceará depositada e catalogada sob o n° 44.566.

O acesso ao patrimônio genético é cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN – sob o número A174C2B.

Para obtenção das sementes, os frutos foram lavados com água destilada e mantidos em recipiente na temperatura de 25°C por 3-4 dias até que atingissem o estágio translúcido-acinzentando. A separação das sementes a partir da polpa e casca dos frutos foi realizada por meio do uso de uma peneira e água potável corrente. As sementes, devidamente separadas, foram deixadas em repouso (25°C) para a completa secagem por 24 h e armazenadas em potes de vidro à temperatura de -20 ° até o uso no processo de extração de proteínas.

5.2 Extração e Purificação da Proteína Transferidora de Lipídeos isolada de semente de *M. citrifolia* L. (Noni) - McLTP1

As sementes foram moídas utilizando um liquidificador e triturador doméstico e a farinha fina resultante desse processamento foi completamente tratada e desengordurada (remoção dos lipídeos) com éter de petróleo (1:10, m/v) em temperatura ambiente e posteriormente armazenada a 4°C até o momento da sua utilização.

A McLTP1 foi obtida através da colaboração do grupo de pesquisa do Prof. Hermógenes David de Oliveira do Laboratório de Química Medicinal do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos - NPDM da Universidade Federal de Ceará, de acordo com a metodologia descrita por Campos et al. (2016) com as modificações introduzidas por Souza (2016), conforme descrito a seguir:

As proteínas foram extraídas da farinha delipidada das sementes de Noni por meio da solução de Tris-HCl 0,05M/NaCl 0,25M, pH 8,5 (1:5 m/v). A suspensão foi agitada durante

3h a 4°C e em seguida, filtrada através de gazes (tecido de filtração). O resíduo do tecido de filtração foi utilizado novamente, ressuscitado no tampão de extração na proporção de 1:3 (m/v), agitado durante 2h e depois filtrado. Os filtrados resultantes foram misturados, centrifugados a 10.000xg durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976).

O sobrenadante foi submetido a uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 2,5% (m/v) sob agitação em temperatura ambiente. Após 30 minutos a -20 °C para precipitação das proteínas, a fração solúvel de TCA a 2,5% foi centrifugado a 10.000xg durante 30 min a 4°C e o sobrenadante dialisado de forma exaustiva (cut off MW 3kDa) contra água destilada a 4°C sob agitação moderada. Amostras da fração solúvel foram submetidas à ultrafiltração (Vivaspin[®]/cut off 30 kDa) a 8.000 x g (30 minutos, 4 °C), sendo liofilizadas para análise de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970).

5.3 Drogas e Reagentes

As drogas utilizadas *in vivo* foram: Eloxatin[®] (Oxaliplatina, 5mg/ml, Sanofi-Aventis Farmacêutica LTDA, São Paulo, SP, Brasil) diluída em solução glicosada 5% (veículo), McLTP1 foi diluída em solução salina 0,9% (veículo), Óleo de mostarda (isotiocianato de alila, agonista TRPA1, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) diluído em DMSO e PBS e Mentol (agonista TRPM8, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) diluído em X em DMSO e PBS, Cloridrato de cetamina e Cloridrato de xilazina (Syntec do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil).

As drogas e reagentes utilizados para imunofluorescência foram: anticorpos policlonais primários anti-ATF3 (Cat# HPA001562, RRID: AB_1078233, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA), anti-c-Fos (Cat# 2250, RRID: AB_2247211, Cell Signaling Technology[®], Danvers, MA, USA), anti-nitrotirosina (Cat#39B6, RRID: SC_81482, Merck Millipore[®], Billerica, MA, USA); os anticorpos secundários Rabbit anti-mouse IgG com Alexa Fluor 568 (Cat# A10042, RRID: AB_2534017), DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole, Cat# 62,248), ProLong Gold[®] (Cat# P36930) foram adquiridos da Invitrogen[®], Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); anti-NeuN com Alexa Fluor 488 (Cat# MAB377X, RRID: AB_2149209, Merck Millipore[®], Billerica, MA, USA).

As drogas e reagentes utilizados para o teste de malondialdeído (MDA) foram: ácido perclórico (Dinâmica química contemporânea LTDA[®], São Paulo, SP, Brasil), 1,1,3,3-

Tetramethoxypropane (TMP, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Para o teste de quantificação de glutathiona reduzida (GSH) foram: EDTA tetrassódico (Dinâmica química contemporânea LTDA®, São Paulo, SP, Brasil), Ácido Tricloroacético (SYNTH®, São Paulo, SP, Brasil), tris(hidroximetil)aminometano (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico (DTNB, Reagente de Ellman, Thermo Scientific®, Brasil), glutathiona-L reduzida (GSH) (Êxodo Científica®, Brasil).

5.4 Animais e aspectos éticos da pesquisa

Para realização dos ensaios *in vivo*, foram utilizados 88 (n=8 por grupo) camundongos Swiss (*Mus musculus*) adultos, machos, com massa corpórea entre 25-30g, cedidos pelo Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno com tampa de plástico com grade de aço inox e filtro, forradas com maravalha autoclavada. A temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 2$, com exaustão de ar), a umidade (45-65%) e a quantidade de ruído foram mantidas dentro das condições ideais e controladas. O fotoperíodo foi de ciclos claro/escuro de 12/12h diárias. A comida (ração Fri-Lab® camundongos) e a água filtrada foi fornecida *ad libitum*.

Os animais foram manipulados de acordo com procedimentos para o uso científico de animais estabelecido pela lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e em concordância com os Princípios Éticos para o uso de Animais de Laboratório preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e uso aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa animal (CEUA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob nº 36/17.

Quanto aos aspectos éticos, os animais submetidos à indução da neuropatia sensitiva periférica, foram avaliados diariamente durante o período do estudo a partir de observações clínicas e comportamentais no horário de 8:00 às 12:00 h (considerando o período de pico de efeitos previstos após a administração) a partir da escala de Grimace para camundongos, no qual foram avaliados atentamente quanto ao trofismo muscular, coloração e aspectos dos pelos e olhos, alterações no SNC (estado consciente, atividade e coordenação motora e reflexos e outros aspectos), sinais de infecção local ou generalizada, marchas, sinais de alterações posturais e comportamentais (SOTOCINA, et al., 2011). Além disso, os animais

foram avaliados ponderalmente quanto à massa corpórea, onde foram pesados individualmente em balança analítica diariamente.

Em condições de desconforto ou sofrimento, os animais foram removidos ou excluídos do estudo por questões de bem-estar animal, no qual foram anestesiados por overdose anestésica (Cloridrato de cetamina 270 mg/kg e Cloridrato de xilazina 30mg/kg) e submetidos à necropsia, para avaliação de todas as alterações estruturais ou morfológicas.

Foram considerados critérios de retirada dos animais dos testes (ponto final humanitário): perda de peso, perda dos reflexos nervosos, incoordenação motora, ataxia intensa e também os animais que estavam no nível 2 dos critérios da escala de Grimace para camundongos (LANGFORD, et al., 2010; SOTOCINA, et al., 2011).

O número de animais e os estímulos nociceptivos usados foram o mínimo necessário possível para demonstrar os efeitos consistente do tratamento proposto. Todos os esforços foram realizados para minimizar ou reduzir a dor, o sofrimento e o estresse. A alocação dos animais para os grupos de tratamento foi randomizado pelo computador com o uso de um randomizador de pesquisa (<https://www.randomizer.org/>)

5.5 Protocolos Experimentais

5.5.1 Desenho experimental para os Testes de Neuropatia Induzida por Oxaliplatina

5.5.1.1 Protocolo I (Dose-resposta – escolha da dose de McLTP1)

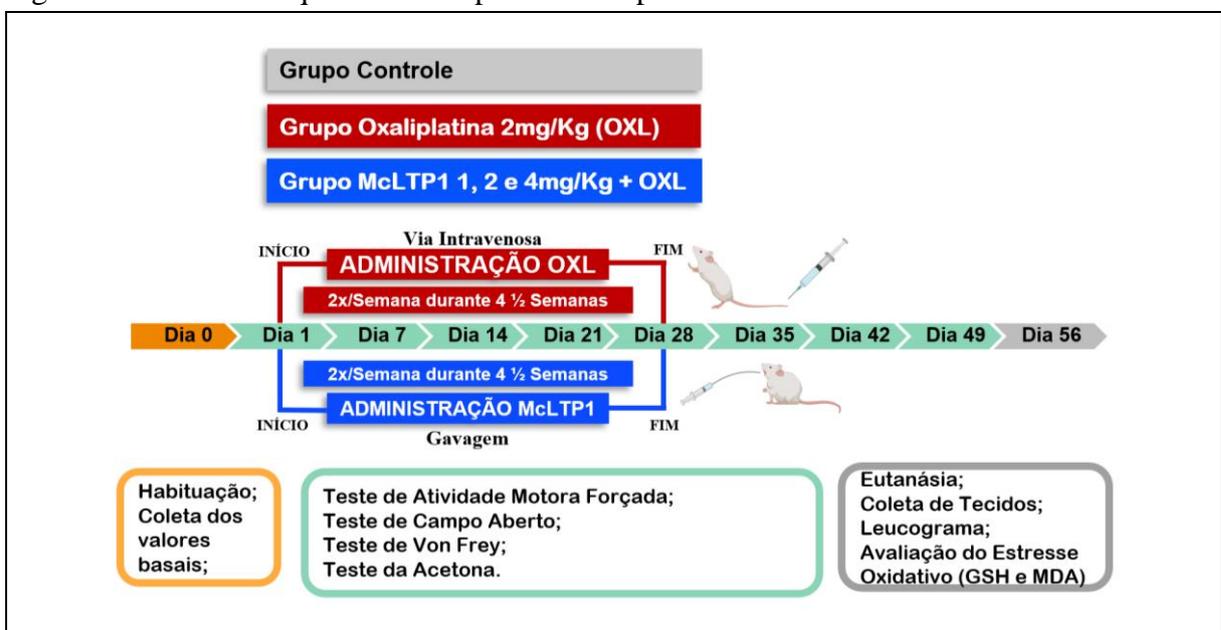
Os animais foram divididos em 3 grupos de 8 animais:

- Controle (solução glicosada 5% i.v.)
- Oxaliplatina (2 mg/kg; i.v.) + veiculo (solução salina 0,9%, gavagem)
- Oxaliplatina + McLTP1 1, 2, e 4 mg/kg (gavagem)

Inicialmente, foram obtidas 24 horas antes da indução da neuropatia por oxaliplatina as basais dos testes de hiperalgesia mecânica plantar, da acetona e do teste de atividade motora forçada. Nos dias consecutivos, os animais receberam uma injeção intravenosa na veia lateral da cauda de 2mg/kg de oxaliplatina duas vezes por semana (por 4,5 semanas, 9 aplicações) (FIGURA 7).

A salina e a McLTP1 nas doses de 1, 2 e 4 mg/kg, por gavagem, foram administradas concomitantemente 60 minutos antes de cada injeção de oxaliplatina. Os testes nociceptivos (teste de hiperalgesia mecânica plantar e da acetona) e comportamentais/motores (teste de atividade motora forçada e campo aberto) (Quadro 3) foram realizados no tempo zero e subsequentemente uma vez por semana por 56 dias, em dias diferentes das injeções de oxaliplatina e da McLTP1. A análise histológica, por imunofluorescência e os testes bioquímicos antioxidantes foram realizados em tecido coletados nos períodos de 28 e 56 dias após o início das injeções de oxaliplatina e da McLTP1 (FIGURA 7).

Figura 7 – Desenho esquemático do protocolo experimental I.



Fonte: dados do estudo. A figura representa a progressão do protocolo experimental I em camundongos submetidos à administração crônica concomitante de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (1, 2 e 4 mg/kg, vo) em 8 animais por grupo. As amostras coletadas na eutanásia foram gânglios da raiz dorsal (GRD), medula espinal (L3-L5), nervos ciáticos bilaterais e sangue. Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*); MDA (malondialdeído); GSH (Glutathiona reduzida).

Quadro 2 – Detalhamento dos testes experimentais realizados e do número de animais utilizados no protocolo experimental I.

Teste experimental	Sigla	Descrição	Animais por experimento	Testes nociceptivos	Teste comportamentais	Material coletados no dia da eutanásia
Hiperalgisia mecânica	HM	Animais submetidos à avaliação da hiperalgisia mecânica plantar	40	Teste de Von Frey realizados nos dias experimentais 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56.		Gânglios da raiz dorsal (GRD), medula espinal (segmento L3-L5) para imunofluorescência; nervos ciáticos bilaterais para histopatologia; e sangue periférico para leucograma
Alodínia térmica pelo frio	ATF	Animais submetidos à avaliação da alodínia térmica plantar pelo frio	40	Teste da acetona realizados nos dias experimentais 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56.		
Avaliação comportamental motora	ACM	Animais submetidos à avaliação comportamental/ motora	40		Teste de campo aberto (teste de Open Field) realizados nos dias experimentais 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56.	
Atividade motora forçada	AMF	Animais submetidos à avaliação da Atividade motora forçada	40		Teste de atividade motora forçada (Rota Rod) realizados nos dias experimentais 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56.	
Total			40			

Fonte: dados do estudo. O Quadro representa o detalhamento dos testes experimentais realizados e do número de animais utilizados no protocolo experimental I em camundongos submetidos à administração crônica concomitante de oxaliplatina (2 mg/kg, i.v.) e McLTP1 (1, 2 e 4 mg/kg, v.o.). As amostras coletadas na eutanásia foram gânglios da raiz dorsal (GRD), medula espinal (L3-L5), nervos ciáticos bilaterais e sangue. Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*); MDA (malondialdeído); GSH (Glutathiona reduzida).

5.5.1.2 Protocolo II (dose de McLTP1- 4mg/kg, com administração diária)

Os animais foram divididos em 3 grupos de 8 animais:

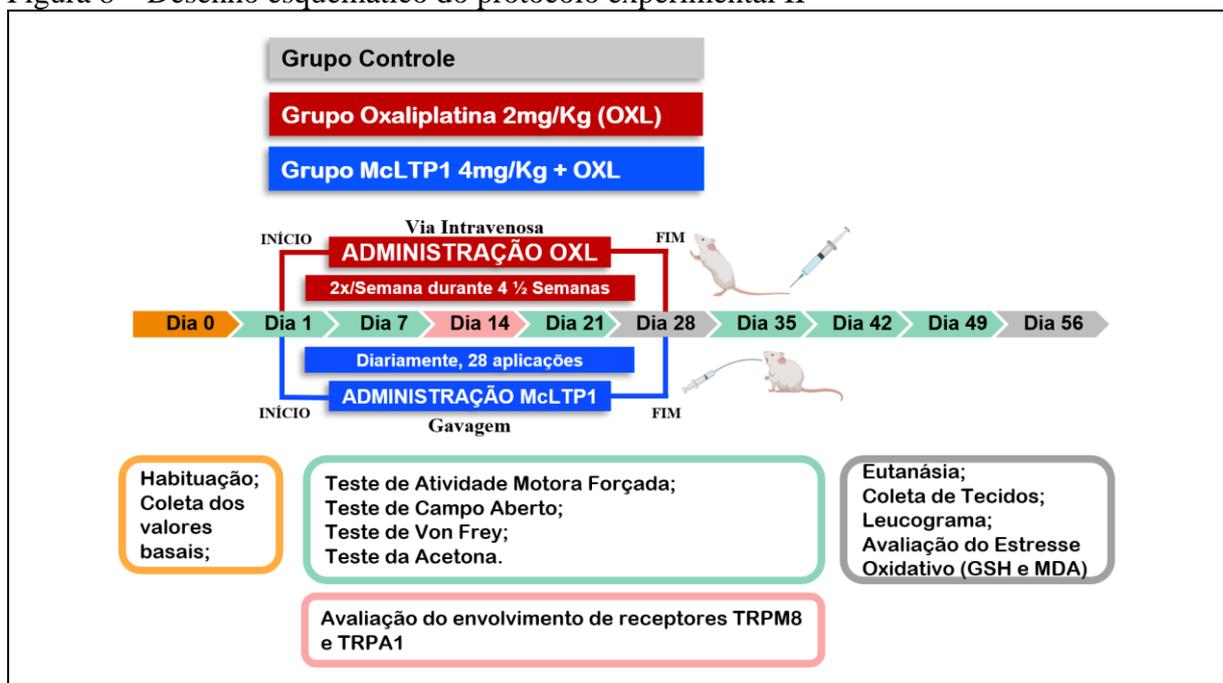
- Controle (solução glicosada 5% i.v.)
- Oxaliplatina (2 mg/kg; i.v.) + veículo (solução salina 0,9%, gavagem)
- Oxaliplatina + McLTP1 4 mg/kg (diariamente)

Inicialmente, foram obtidas 24 horas antes da indução da neuropatia por oxaliplatina as basais dos testes de hiperalgisia mecânica plantar, da acetona e do teste de atividade motora forçada. Nos dias consecutivos, os animais receberam uma injeção intravenosa na veia

lateral da cauda de 2mg/kg de oxaliplatina duas vezes por semana (por 4,5 semanas, 9 aplicações) (FIGURA 8).

A salina e a McLTP1 na dose de 4 mg/kg, por gavagem, foram administradas diariamente no mesmo horário e 60 minutos antes de cada injeção de oxaliplatina (nos dias em que eram administrados concomitantes). Os testes nociceptivos (teste de hiperalgesia mecânica plantar e da acetona) e comportamentais/motores (teste de atividade motora forçada e campo aberto) (Quadro 4) foram realizados no tempo zero e subsequentemente uma vez por semana por 56 dias, em dias diferentes das injeções de oxaliplatina e da McLTP1. A análise histológica, por imunofluorescência e os testes bioquímicos antioxidantes foram realizados em tecido coletados nos períodos de 28 e 56 dias após o início das injeções de oxaliplatina e da McLTP1 (FIGURA 8).

Figura 8 – Desenho esquemático do protocolo experimental II



Fonte: dados do estudo. A figura representa a progressão do protocolo experimental II em camundongos submetidos à administração crônica concomitante de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (1, 2 e 4 mg/kg, vo, diariamente) em 8 animais por grupo. As amostras coletadas na eutanásia foram gânglios da raiz dorsal (GRD), medula espinal (L3-L5), nervos ciáticos bilaterais e sangue. Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*); MDA (malondialdeído); GSH (Glutationa reduzida).

Quadro 3 – Detalhamento dos testes experimentais realizados e do número de animais utilizados no protocolo experimental II.

Teste experimental	Sigla	Descrição	Animais por experimento	Testes nociceptivos	Teste comportamentais	Material coletados no dia da eutanásia
Hiperálgia mecânica	HM	Animais submetidos à avaliação da hiperálgia mecânica plantar	24	Teste de Von Frey realizados nos dias experimentais 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56.		Gânglios da raiz dorsal (GRD), medula espinal (segmento L3-L5) para imunofluorescência; testes de GSH e MDA; nervos ciáticos bilaterais para histopatologia e testes de GSH e MDA e MPO; e sangue periférico para leucograma
Alodínia térmica pelo frio	ATF	Animais submetidos à avaliação da alodínia térmica plantar pelo frio (10°C)	24	Teste da acetona realizados nos dias experimentais 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56.		
Avaliação da participação dos receptores TRPA1 e TRPM8	APR	Animais submetidos à avaliação da hiperálgia plantar com mentol e óleo de mostarda	24	Teste do mentol e do óleo de mostarda realizados no dia experimental 14.		
Avaliação comportamental motora	ACM	Animais submetidos à avaliação comportamental/ motora	24		Teste de campo aberto (teste de Open Field) realizados nos dias experimentais 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56.	
Atividade motora forçada	AMF	Animais submetidos à avaliação da Atividade motora forçada	24		Teste de atividade motora forçada (Rota Rod) realizados nos dias experimentais 0, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56.	
Total			48			

Fonte: dados do estudo. O Quadro representa o detalhamento dos testes experimentais realizados e do número de animais utilizados no protocolo experimental I em camundongos submetidos à administração crônica concomitante de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (1, 2 e 4 mg/kg, vo). As amostras coletadas na eutanásia foram gânglios da raiz dorsal (GRD), medula espinal (L3-L5), nervos ciáticos bilaterais e sangue. Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*); MDA (malondialdeído); GSH (Glutathiona reduzida).

5.5.2.1 Indução da neuropatia sensitiva periférica por oxaliplatina (OXL): Doses, diluição e administração de oxaliplatina

A oxaliplatina (Eloxatin®, 5mg/ml, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foi administrada na dose de 2 mg/kg, de acordo com publicações prévias do grupo (PONTES, 2009; PONTES; LINO; VALE, 2018; PEREIRA et al., 2018; PEREIRA et al., 2021). A oxaliplatina foi diluída em solução glicosada estéril a 5% e administrada durante 4,5 semanas (2X/semana, total de 9 aplicações), na veia lateral da cauda com agulha de 13X0,45mm em seringa de 1ml.

O fármaco foi preparado sempre no dia dos experimentos e administrado por injeção intravenosa (i.v.) num volume de 0,1ml/10g de peso corporal. Os animais do controle receberam o mesmo volume de solução glicosada a 5% estéril, ou veículo (solução salina a 0,9% estéril).

Para avaliação da progressão e desenvolvimento da neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina foram realizados os testes nociceptivos, comportamentais/ motores, descritos a seguir, bem como, através dos marcadores, como C-fos e ATF-3 pela imunofluorescência.

5.5.2.2 Teste de hiperalgesia mecânica plantar

Para determinar a sensibilidade mecânica, o teste foi realizado através de um aparelho que registra a pressão a partir de uma haste fixa acoplado a um transdutor (analgesímetro *Von Frey* eletrônico digital, insight, instruments LTDA, São Paulo, SP, Brasil). Os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico (8 x 8 x 18 cm) apoiados em uma superfície elevada (30 cm) e coberto com uma malha de arame. Um espelho foi colocado abaixo dos compartimentos de acrílico, em inclinação com a superfície, para permitir a observação clara das patas.

Após a aclimação dos animais neste ambiente durante 20 minutos, foram aplicados estímulos com a haste fixa do aparelho com força constante na superfície plantar da pata posterior direita. A força em questão foi alcançada e registrada após a retirada da pata do filamento pelo animal. Essa força foi aplicada 6 vezes, onde foram considerados os três valores mais semelhantes.

Foram consideradas como respostas positivas, aquelas em que o animal realizou movimentos de retirada do membro posterior direito ou a lambida do mesmo, imediatamente

após estimulação mecânica e foram rejeitadas as respostas seguidas de caminhada. (CUNHA, et al., 2004; MARTINOV; et. al., 2013)

Este teste foi realizado após a obtenção prévia de duas medidas basais (com intervalo de 30 min). Concomitante as administrações da oxaliplatina e da McLTP1 os animais foram avaliados semanalmente nos períodos de: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 dias. Todo teste foi realizado em uma sala tranquila e no período entre 8-18h e iluminado por uma lâmpada vermelha de 60W. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média das respostas nos períodos supracitados.

5.5.2.3 Avaliação da alodínia térmica ao frio

Para avaliação da alodínia ao frio, os animais foram colocados sobre uma plataforma com o assoalho em malha perfurada de metal (célula de 0,8 x 0,8 cm) com compartimentos de acrílicos transparente (8 x 8 x 18 cm) e elevada a 30 cm da superfície, permitindo acesso à superfície plantar das patas. Um espelho foi colocado abaixo dos compartimentos de acrílico, em inclinação com a superfície, para permitir a observação clara das patas. (CHOI et al., 1994; CASPANI et al., 2009; GAUCHAN, et al., 2009)

Após a aclimação dos animais, individualmente por 15 minutos, até diminuir a atividade exploratória, a alodínia ao frio foi medida com a utilização da acetona como descrito por Choi et al. (1994) a qual possui temperatura precisa de 10°C. Com o auxílio de uma seringa de 1 ml, 50 μ l de acetona foram aplicados no centro da superfície plantar da pata posterior esquerda do animal. A acetona provoca comportamentos e respostas de retirada das patas em amplitude e duração (CHOI et al., 1994), agitação e elevação da pata, além de lambidas (CASPANI et al., 2009), especialmente nos animais neuropáticos.

Cada animal foi observado a partir dessas respostas, caracterizadas como comportamento nocifensivo, e o tempo de resposta foi contabilizado por um minuto. O tempo gasto pelo animal com esse comportamento foi mensurado em segundos, com o auxílio de um cronômetro. Devido as respostas ocorrerem de forma intermitentes, o cronômetro foi parado e ativado de acordo o comportamento do animal (GAUCHAN, et al., 2009).

A duração da reação foi medida e analisada como tempo cumulativo de nocicepção (VISSERS; MEERT 2005), no qual foram avaliados semanalmente nos períodos de: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 dias, e os valores obtidos foram expressos como como média \pm erro padrão da média do tempo cumulativo de nocicepção em segundos. Todo teste foi realizado

em uma sala tranquila e no período entre 8-18h e iluminado por uma lâmpada vermelha de 60W.

5.5.2.4 Teste de atividade motora forçada

Para determinar se os efeitos antinociceptivos da McLTP1 não foram causados por quaisquer perturbações no sistema nervoso central como comprometimento da coordenação motora/exploratória ou sedação, que pode ser mal interpretada ou mimetizar uma atividade antinociceptiva, foi realizada a avaliação da atividade motora forçada dos camundongos. (DUNHAM e MIYA, 1957)

Para este teste, os camundongos foram colocados em um aparelho (Rota Rod®, insight, instruments LTDA, São Paulo, SP, Brasil) com uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm, que possui aceleração progressiva programada (4-37rpm) e baias com sensor de detecção de quedas e cronometragem. Os animais foram selecionados em uma sessão de treino 24 horas antes do experimento, no qual os que permaneceram por 2 minutos (5,5rpm/120s), foram considerados aptos ao teste. (DUNHAM e MIYA, 1957).

Decorrido as 24 horas, concomitante as administrações de oxaliplatina e os tratamentos, os animais foram avaliados semanalmente nos períodos de: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 dias, onde foi registrado o número de quedas sofridas e o tempo de permanência durante 2 minutos (5,5rpm/120s). Todo teste foi realizado em uma sala tranquila e no período entre 8-18h e iluminado por uma lâmpada vermelha de 60W. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média do tempo de permanência na barra giratória e a mediana do número de quedas.

5.5.2.5 Teste de campo aberto

Para avaliar se a McLTP1 não está modulando ou interferindo sobre a capacidade comportamental motora/exploratória, rebaixada pela própria ação oxaliplatina; ou ocasionando efeito ansiolítico/sedativo, podendo levar a uma má interpretação desse agente como antinociceptivo, foi realizado a avaliação da atividade locomotora e/ou exploratória dos animais por meio do teste de campo aberto ou open field. (ARCHER, 1973; MARTIN; BAETTIG; BIRCHER, 1980)

Para este teste, os camundongos foram colocados em um campo aberto que consiste em uma arena confeccionada de vidro transparente e piso preto (30x30x15cm), dividida em nove quadrantes iguais.

Após 30 minutos dos respectivos tratamentos, cada animal foi colocado no centro do campo aberto e observado por 5 minutos (ARCHER, 1973), no qual os parâmetros comportamentais a serem analisados foram: o número de cruzamentos (NC - exploração horizontal, contando os quadrantes cruzados pelo animal, quando este se encontra com as quatro patas dentro do mesmo quadrante), o número de *rearing* (NR – exploração vertical, postura na qual o animal fica apoiado somente pelas patas traseiras), o número de *grooming* (NG – ação de autolimpeza em um ambiente novo permite avaliar duas atividades: a capacidade estimulante ou depressora de uma dada substância) e o número de defecações (ND – número de fezes presentes em todo aparato) (ARCHER, 1973; MARTIN; BAETTIG; BIRCHER, 1980; OLSEN, 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2004)

O comportamento foi avaliado em tempo real e o campo aberto foi limpo entre cada camundongo utilizando álcool etílico a 20%. A avaliação do comportamento no campo aberto, foi realizado concomitante as administrações de oxaliplatina e os tratamentos, onde os animais foram avaliados semanalmente nos períodos de: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 dias. Todo teste foi realizado em uma sala tranquila e no período entre 8 e 18h e iluminado por uma lâmpada vermelha de 60W. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média do número de cruzamento, *rearing* e *grooming* e defecações.

5.5.2.6 Avaliação da participação de receptores TRPA1 e TRPM8 no efeito antinociceptivo da McLTP1

Para avaliar a participação de receptores TRPA1 e TRPM8 no efeito antinociceptivo da McLTP1 em animais com a NSP induzida por OXL, foi feita a injeção intraplantar de agonistas desses receptores.

No 14º dia, após o início da indução da NSP por oxaliplatina, os camundongos, receberam 20 μ l de mentol (agonista TRPM8; 20 μ l, 0,1%, Sigma-Aldrich®, Alemanha) ou óleo de mostarda (isotiocianato de alila, agonista TRPA1; 20 μ l; 0.1%, Sigma-Aldrich®, Alemanha) dissolvidos em 90% de DMSO e 10% de PBS, que foram aplicados na superfície plantar da pata traseira direita (HAMITY; WHITE; HAMMOND, 2010). Os camundongos foram observados por 5 minutos e o tempo gasto lambendo, ou sacudindo a pata traseira foi

medido. Todos os animais receberam os agonistas, inclusive os do grupo controle (CASPERI et al., 2009)

Para ambos os experimentos, antes da aplicação, os animais foram alocados individualmente por 20 minutos para ambientação em um cilindro transparente.

Adicionalmente, todos os animais foram testados quanto ao desenvolvimento de alodinia térmica, pelo teste da acetona, para avaliar e acompanhar a progressão da neuropatia sensitiva periférica provocada pela oxaliplatina em camundongos até o 14º dia, como um controle do experimento.

5.5.2.7 Avaliação histológica do nervo ciático

Para avaliar as possíveis modificações histológicas provocadas pela oxaliplatina nos tecidos nervosos, foram realizados cortes histológicos de nervos ciáticos dos animais tratados com veículo, oxaliplatina e McLTP1. Após a eutanásia dos animais por sobredose de anestésico, foram retiradas porções bilaterais dos nervos ciáticos que se estendem do início do nervo (região proximal, logo após o gânglio da raiz dorsal) até a região distal na altura fossa poplítea do animal.

O tecido retirado foi fixado em formaldeído tamponado a 10% (24h), depois foram desidratadas em álcool a 70%, sendo em seguida parafinizadas para corte através de um micrótomo (4 µm) e confecção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina para análise em microscopia ótica. A análise das amostras foi realizada pela Professora Dra. Ana Paula Nunes Negreiros, histopatologista do Laboratório de Histopatologia do Núcleo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos (NPDM) da UFC.

5.5.2.8 Coleta da medula espinal e gânglio da raiz dorsal para imunofluorescência e testes de avaliação do estresse oxidativo

Para a retirada de amostras de medula espinal e gânglio da raiz dorsal, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 100 mg/kg e cloridrato de xilazina 10mg/kg e perfundidos por via intracardíaca com 40ml de solução salina, seguida de 40 ml de solução de paraformaldeído (PFA) a 4% em 0,1M salina tampão fosfato (PBS). Imediatamente após a perfusão e confirmação de morte do animal, foram removidos os segmentos lombares (L3-L5) da medula espinal e os gânglios da raiz dorsal.

Para a imunofluorescência, após a remoção das amostras acima, foi feita a crioproteção em sacarose 30% por 2 dias. Após esse período, os tecidos foram acondicionados com tissue-tek® a temperatura de -80°C (em freezer) até o momento da utilização.

Para os testes bioquímicos de avaliação do estresse oxidativo, por meio dos métodos de quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e determinação da produção de substâncias ácida reativa com ácido tio barbitúrico – TBARS (Malonaldeído), não foi realizada perfusão intracárdica com PFA. Para esse protocolo os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica e foi feita a remoção das amostras citadas. Os tecidos foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido e mantidos congelados em freezer a -80°C, até o momento da utilização.

5.5.2.9 Análise por imunofluorescência em medula espinal e gânglio da raiz dorsal

Foram feitos cortes com espessura de 10 µm (para gânglios) e 20 µm (para medula) no criostato (Leica CM1850), à temperatura de -24°C e colocados em lâminas silanizadas específicas para protocolo de imunofluorescência (Dako Denmark, North America, Inc., California, USA). Os cortes foram fixados por 2 minutos em metanol e depois ficaram imersos em tampão fosfato (PBS) até o momento de começar a imunofluorescência. Em seguida, foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato 0,1M (pH 6,1) por 15 minutos sob aquecimento a uma temperatura de 95°C em banho-maria. Após o resfriamento em temperatura ambiente por 20 minutos, foi feita a permeabilização da membrana nuclear para marcadores nucleares com triton X-100 (0,1%) e o bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 5% acrescida de glicina 0,3M por 30 minutos para todas as lâminas.

Os cortes foram lavados com por 5 minutos em PBS e incubados, durante a noite toda, à temperatura de 4°C, com os anticorpos primário anti-c-Fos, anti-ATF-3, anti-NeuN conjugado com Alexa flúor 488, anti-Nitrotirosina (detalhados no Quadro 4).

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS por 5 minutos e incubadas em temperatura ambiente, durante 1 hora e 30 minutos, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa flúor 568 (Quadro 5). Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com PBS, incubadas com uma solução de 0,002% com o marcador nuclear DAPI (Invitrogen) e depois montadas com “Prolong Gold” (Invitrogen®) e fotografadas no microscópio de varredura a laser confocal (LSM 710, Zeiss).

Quadro 4 – Anticorpos utilizados para imunofluorescência

Primário			
Rabbit Anti-ATF3	1:200	Sigma-Aldrich®	Cat# HPA001562, RRID: AB_1078233
Rabbit Anti-c-Fos	1:200	Cell Signaling Technology®	Cat# 2250, RRID: AB_2247211
Rabbit Anti-nitrotirosina	1:200	Merck Millipore®	Cat# 39B6, RRID: SC_81482
Secundário			
Donkey anti-rabbit IgG com Alexa Fluor 568 Conjugado	1:400	Invitrogen®	Cat# A10042, RRID: AB_2534017
Conjugado			
Anti-NeuN conjugado com Alexa flúor 488	1:100	Merck Millipore®	(Cat# A10042, RRID: AB_2534017)

Fonte: dados do estudo. O Quadro representa o detalhamento dos Anticorpos utilizados para imunofluorescência. Da esquerda para direita, a descrição do alvo e a espécie onde foi produzido, a diluição utilizada, a empresa produtora e a referência do produto.

Foi feita a quantificação da área marcada nas fotos diferenciando as áreas marcadas (pixels), pela saturação de cor associada à marcação (vermelha ou verde). Para isso, foi utilizado o programa Fiji Image J®, onde o procedimento foi baseado na quantificação da área marcada pela não marcada ou saturação da cor somada à marcação positiva para um marcador específico.

Os limites necessários para definição de área (pixels) marcada e não marcada foram definidos previamente. A marcação considerada positiva se deu a partir da co-localização no núcleo, citoplasma ou corpos dos neurônios do fluoróforo vermelho (568, para os anticorpos anti-c-Fos, anti-ATF-3 e anti-Nitrotirosina) e do fluoróforo verde (488, para o anticorpo anti-NeuN) presentes nos corpos celulares dos neurônios. Para a quantificação da área marcada, foram utilizadas 6 fotos (de animais diferentes) por grupo experimental.

Os resultados dessa quantificação foram exibidos em porcentagem, no qual foi calculada a marcação positiva de um determinado marcador em relação a área total (100%) da foto. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média da porcentagem de área de fluorescente (área marcada).

5.5.2.10 Testes bioquímicos de estresse oxidativo

5.5.2.10.1 Quantificação de glutathiona reduzida (GSH)

O método utilizado baseia-se na reação do reagente de Ellman ou ácido 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto (GSSG) com o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico, conforme o método de Sedlak e Lindsay (1968).

As amostras (medula espinal e nervos ciáticos bilaterais) foram descongeladas e homogeneizadas separadamente. O preparo das amostras foi feito coletando 40 µl de cada amostra do homogenato a 10% em EDTA 0,02M da medula e dos nervos ciáticos, e adicionada a um eppendorf, seguido da adição de 60 µl de TCA (ácido tricloro acético) 10%.

O material foi centrifugado a 5000 rpm, por 15 min a 4°C, e retirado 60 µL do sobrenadante que foi adicionado à solução de DTNB em tampão Tris. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de GSH padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100) e os resultados foram expressos em µg/mg de tecido. Em até 5 minutos do início da reação, a absorbância foi lida a 412 nm contra um reagente branco (sem homogenato), onde a concentração dos níveis de GSH foi registrado e expressos como média ± erro padrão da média da concentração em microgramas por gramas de tecido (µg/mg de tecido).

5.5.2.10.2 Determinação da produção de substâncias ácida reativa com ácido tio barbitúrico – TBARS (Malonaldeído - MDA)

O estresse oxidativo foi avaliado através do método de Draper e Hadely (1998) pelo ensaio de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), um indicador de peroxidação lipídica em homogenatos de nervos ciáticos e medulas.

As amostras (medula espinal e nervos ciáticos bilaterais) foram descongeladas e homogeneizadas separadamente. No dia do ensaio 250 µl do homogenato (10% em tampão fosfato de potássio) foi introduzido em eppendorfs e incubado em banho de água a temperatura de 37°C. Após a incubação, 400 µl de ácido perclórico a 35% foram adicionados para parar a peroxidação. Após agitação e centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante (600 µl) foi retirado e foi adicionado 200µl de ácido tiobarbitúrico 0,8%.

A mistura foi levada ao banho maria por 30 minutos a uma temperatura variável de 95 - 100°C. A solução então foi retirada e colocada para esfriar. Após isso, foi feita à leitura da absorbância no comprimento de 532nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias

concentrações de malondialdeído (MDA) padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100) e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média da concentração de MDA em nanomols por gramas de tecido (nmol/ g de tecido).

5.5.2.11 Leucometria total e diferencial em sangue periférico

Os animais foram levemente anestesiados com cloridrato de cetamina 100 mg/kg e cloridrato de xilazina (10mg/kg, i.p.) e foi realizada a retirada de sangue do plexo retroorbital para contagens total e diferencial de leucócitos.

Para a contagem total foram coletados 20 μ L de sangue que foram imediatamente diluídos e homogeneizados em 380 μ L de solução de azul de Turk (Ácido acético 2%, Violeta Genciana 0,2%).

O número total de leucócitos foi determinado utilizando-se câmara de Neubauer (Optik Labor) para verificar o efeito da quimioterapia à base de oxaliplatina na indução da leucopenia. Essa observação serviu como controle da atividade citotóxica do fármaco sobre o animal.

Os resultados da contagem das células contidas nos quatro quadrantes da câmara foram somados e o resultado multiplicado por 20, valor correspondente à diluição realizada e depois por 10, fator de correção para determinar o número de células/mm³. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média do número de células/mm³.

Para contagem diferencial, do sangue coletado conforme supracitado, esfregaços sanguíneos foram confeccionados, fixados e corados pelo método Panóptico de Pappenheim (May-Grunwald-Giemsa). A coloração foi feita com o kit de coloração panótico rápido (LB, Laborclin) da seguinte forma: cada lâmina foi mergulhada 5 vezes (1 segundo cada) no fixador (solução n° 1: solução de triarilmetano 0,1%), 5 vezes no corante ácido (solução n° 2: solução de xantenos 0,1%) e sete vezes no corante básico (solução no 3: solução de tiazinas 0,1%).

Em seguida o esfregaço foi examinado por microscopia de luz com objetiva de 100 X com óleo de imersão, na melhor região do esfregaço para contagem (cauda ou próxima do final do esfregaço), onde as células foram contadas em até cem leucócitos ao longo de toda a lâmina, a partir de um contador mecânico, e anotadas.

Os resultados foram obtidos a partir do número de cada tipo de célula contabilizada, multiplicada pelo número total de leucócitos e dividido pelo número total de células contadas

no esfregaço (100) de cada animal. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média do número de células/mm³.

5.5.2.12 Dosagem de Mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar as possíveis modificações nos neutrófilos provocadas pela oxaliplatina nos tecidos nervosos, foram realizadas análises de nervos ciáticos dos animais tratados com veículo, oxaliplatina e McLTP1. Após a eutanásia dos animais por sobredose de anestésico, foram retiradas porções bilaterais dos nervos ciáticos que se estendem do início do nervo (região proximal, logo após o gânglio da raiz dorsal) até a região distal na altura fossa poplíteia do animal. Para esse teste experimental não foi realizada perfusão intracárdica com PFA e os tecidos foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido e mantidos congelados em freezer a -80°C, até o momento da utilização.

Os tecidos foram inicialmente pesados em balança analítica para determinação do peso úmido e colocados em eppendorfs de 2 ml com 200µl de tampão 1 (NaCl 0,1M, NaPO₄ 0,02 M, EDTA 0,015M, pH 4,7) gelado e foram triturados e homogeneizados em Polytron® (Brinkmann instruments). As amostras foram centrifugadas a 3000rpm/15min/4°C, em seguida o sobrenadante foi retirado e adicionado 1ml de tampão de lise (NaCl 0,2%). As amostras foram vortexadas e centrifugadas novamente e o sobrenadante retirado e desprezado. O tampão 2 foi adicionado ao precipitado, homogeneizados novamente e centrifugados (10.000rpm/15min/4°C).

Em seguida foi realizada a curva de neutrófilos na placa de 96 poços, no primeiro poço foi adicionado 50 µl de tampão fosfato 0,08M com 50 µl de neutrófilos e foi realizada diluição seriada nos poços seguintes. Logo após, foi adicionado 50 µl do sobrenadante das amostras. Em cada poço foi adicionado 25 µl de TMB (3,3,5,5-tetrametilbenzadine (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e em seguida 100 µl de PD-L1, a seguir a reação foi parada com a adição de 75 µl de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) e lida em leitor de placa a 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido.

5.5.2.13 Análise estatística e expressão dos dados

Para análise inicial em todos os testes, foi realizado a verificação da normalidade dos dados através do teste de Saphiro ou Kolmogorov-Smirnov para averiguar se os dados eram paramétricos ou não paramétricos.

Para comparação múltipla dos dados paramétricos, os resultados dos testes foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via (One-Way), ou duas vias (Two-Way) para medidas repetidas com decurso temporal (testes nociceptivos e comportamentais/motores), seguido dos testes de múltiplas comparações (post hoc) de Tukey entre os grupos, para detectar as diferenças entre o grupo controle e os grupos tratamentos.

Para os dados não-paramétricos, os resultados dos testes foram expressos como mediana com variação da mediana (mínimo e máximo) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunns.

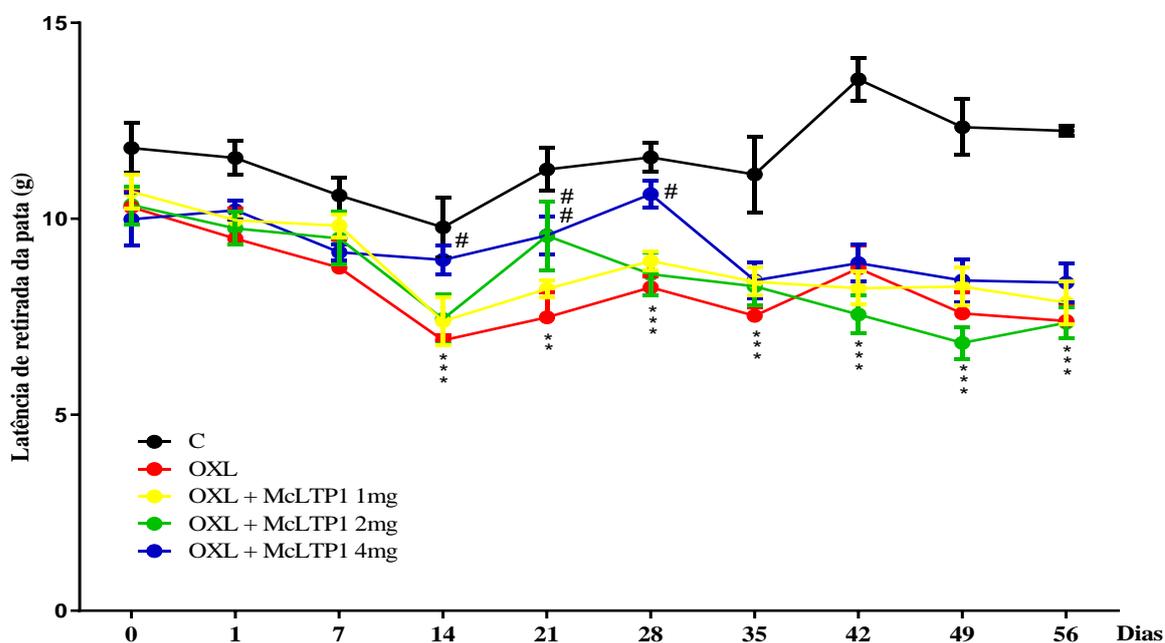
Os cálculos foram realizados a partir do Software estatístico *GraphPad Prism 8.0* (San Diego, CA, EUA), de acordo com os valores obtidos nos testes. Para as diferenças entre os grupos foram consideradas significativas um nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 5% ou $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Efeito da McLTP1 (1 a 4 mg/kg) na hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

A oxaliplatina diminuiu a latência de retirada da pata, significativamente a partir do 14º dia (29,45 %, $P < 0,05$) até o 56º dia (39,62 %; $P < 0,05$) em comparação com o grupo controle (GRÁFICO 1). A McLTP1 4 mg diminuiu a hiperalgesia, de forma significativa, a partir do 14º dia (20,96 % $P < 0,05$) até o 28º dia (20,57 % $P < 0,05$) quando comparado ao grupo no qual foi injetada a oxaliplatina (GRÁFICO 1). As doses de 2mg/kg diminuiu a hiperalgesia, de forma significativa, somente no 21º dia (18,49 % $P < 0,05$). A dose de 1 mg/kg não inibiu a hiperalgesia em nenhum dos tempos testados.

Gráfico 1 – Efeito da McLTP1 na hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

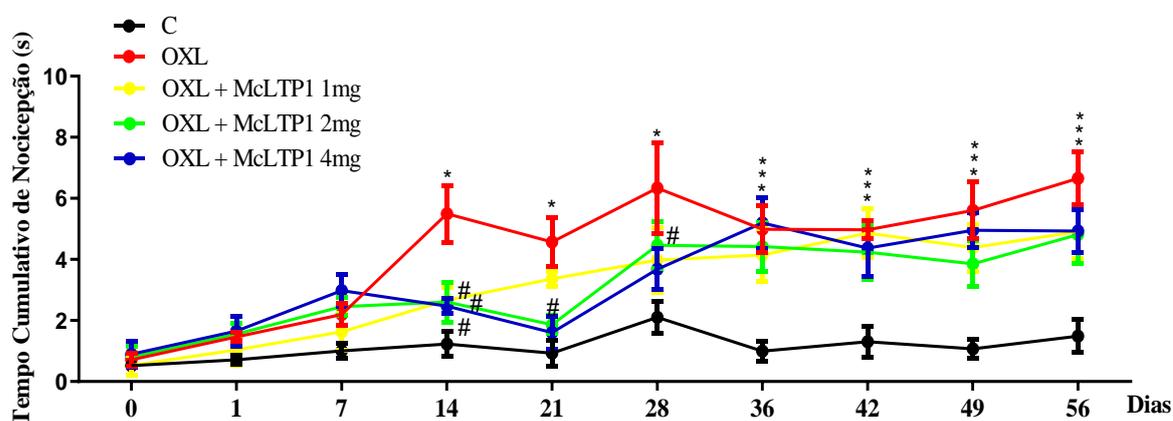


Fonte: dados do estudo. O gráfico representa a progressão da hiperalgesia mecânica plantar em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (1, 2 e 4 mg/kg, vo). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do tempo de latência de retirada da pata em segundos (s) de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$ em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.2 Efeito da McLTP1 (1 a 4 mg/kg) na alodínia térmica pelo frio em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina

A oxaliplatina aumentou o tempo cumulativo de nocicepção na pata a partir do 14º dia (77,60 %; $P < 0,05$) permanecendo até o 56º dia (77,91 %; $P < 0,05$), quando comparado com o grupo controle (GRÁFICO 2). A McLTP1 nas doses 1 e 2 mg/kg, foi capaz de prevenir esse aumento no 14º dia (GRÁFICO 2) enquanto na dose de 4 mg/kg preveniu do 14º dia (55,19 % $P < 0,05$) até o 28º dia (48,88 % $P < 0,05$) mostrando um melhor efeito (GRÁFICO 2).

Gráfico 2 – Efeito da McLTP1 na alodínia térmica pelo frio em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.



Fonte: dados do estudo. O gráfico representa a progressão da alodínia térmica pelo frio (10°C), no teste da acetona, em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (1, 2 e 4 mg/kg, vo). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do tempo cumulativo de nocicepção em segundos (s) de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$ em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); V (veículo da McLTP1); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

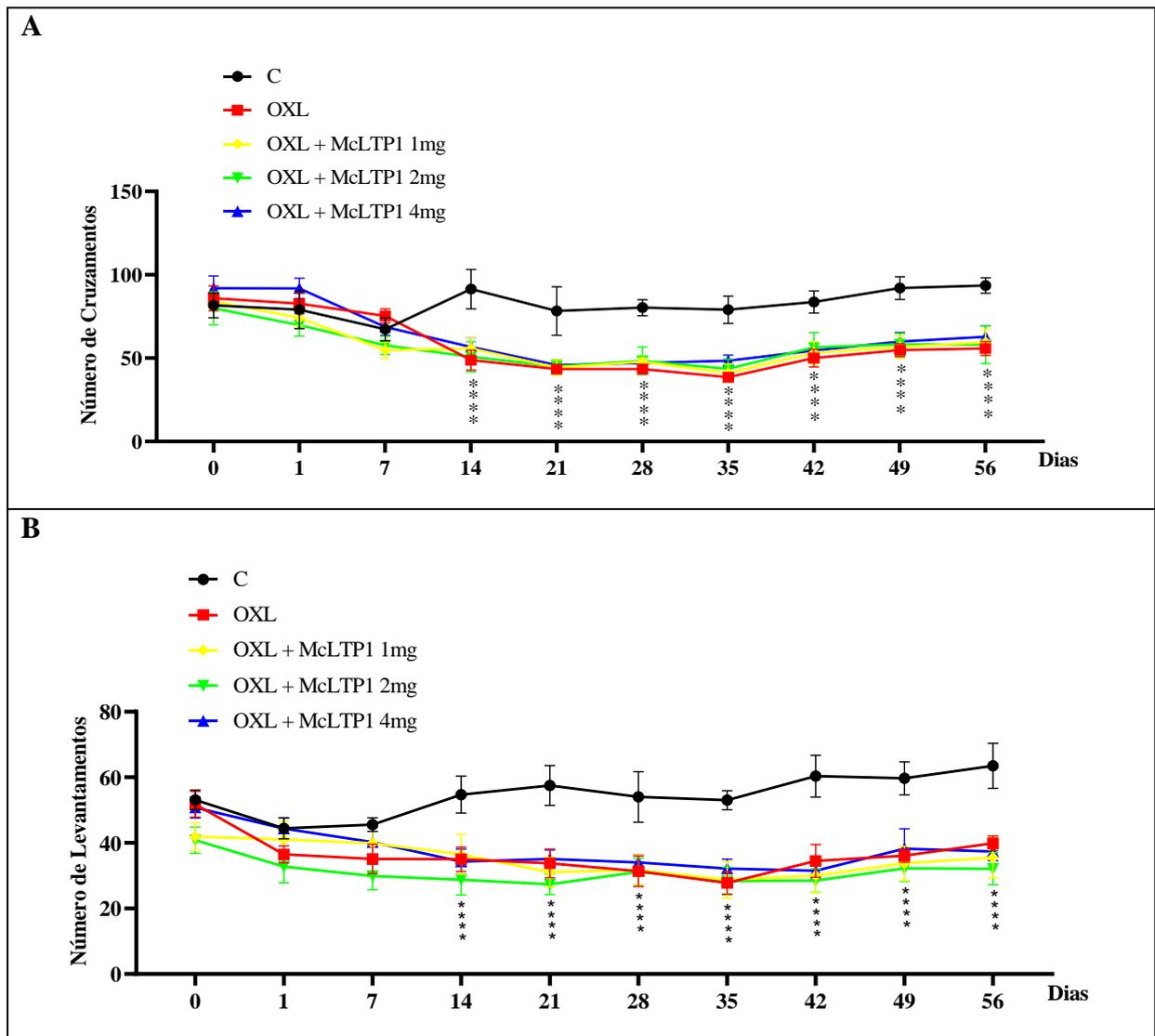
6.3 Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 (1 a 4 mg/kg) em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

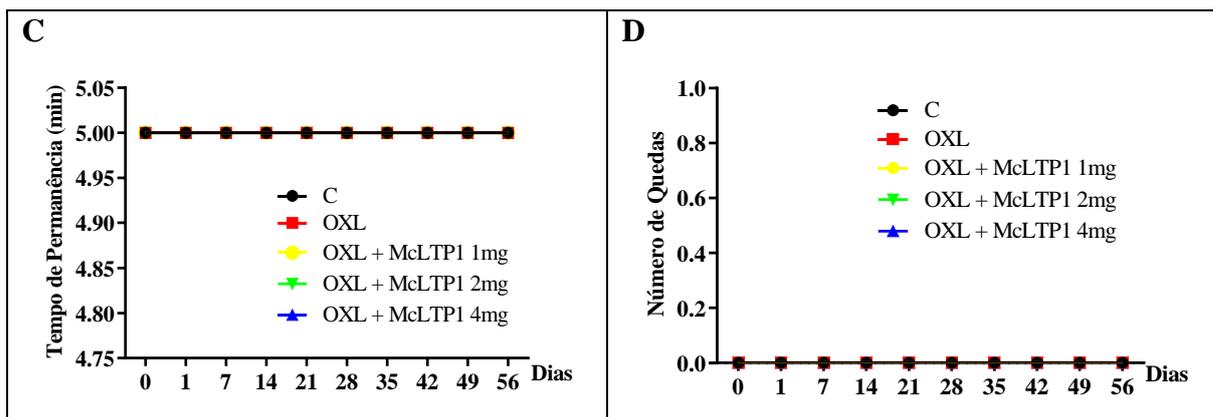
No teste de campo aberto, a oxaliplatina diminuiu o número de cruzamentos e levantamentos a partir do 14º dia (44,36 % e 33,28 %; $P < 0,05$ e $P < 0,05$, respectivamente) até o 56º dia (40,43 % e 37,21 %; $P < 0,05$ e $P < 0,05$, respectivamente), quando comparado com o grupo controle (GRÁFICO 3, A-B). O tratamento com a McLTP1 1, 2 e 4 mg/kg não modificou as alterações comportamentais provocadas pela oxaliplatina a partir do 14º dia até o 56º dia (GRÁFICO 3, A-B). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais

com a McLTP1 1, 2 e 4 mg administrada de forma concomitante com a oxaliplatina (GRÁFICO 3, A-B).

No teste Rota-Rod, a oxaliplatina e a McLTP1 1, 2 e 4 mg mais a oxaliplatina, não interferiram no desempenho motor dos camundongos (GRÁFICO 3, C-D).

Gráfico 3 – Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.



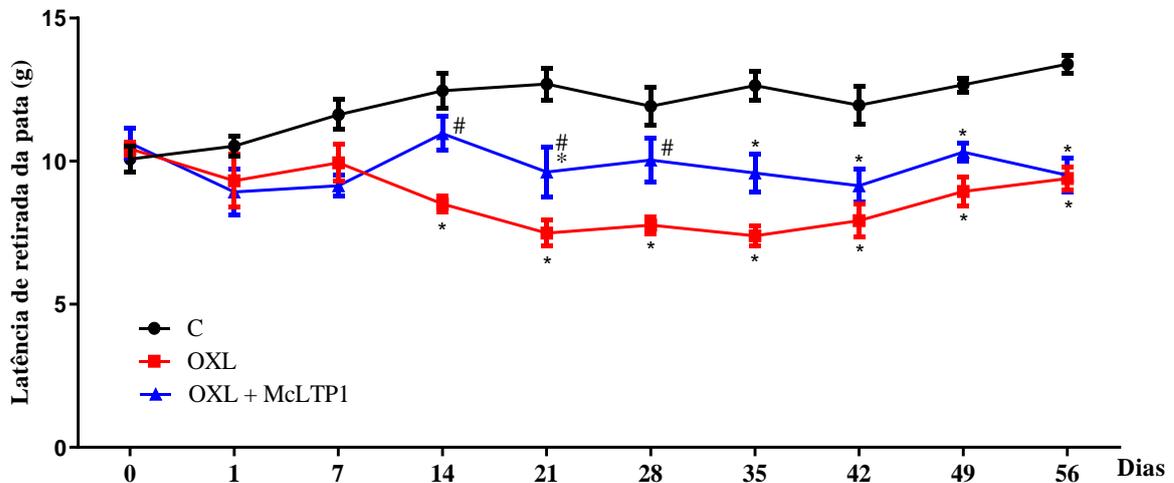


Fonte: dados do estudo. O gráfico representa a progressão dos Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (1, 2 e 4 mg/kg, vo), a partir do teste de campo aberto (teste de Open Field) e do teste de atividade motora forçada (teste de Rota Rod). (A): o número de cruzamentos entre os quadrantes da caixa no teste de Campo Aberto; (B): número de levantamentos corporais na caixa, no teste de Campo Aberto; (C): mostra o tempo de permanência em minutos (min) na barra giratória no teste de Rota-Rod; (D): número de quedas da barra giratória no teste de Rota-Rod. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.4 Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, na hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

A oxaliplatina diminuiu a latência de retirada da pata, significativamente a partir do 14º dia (31,72 %, $P < 0,05$) até o 56º dia (29,82 %; $P < 0,05$) em comparação com o grupo controle (GRÁFICO 4). A McLTP1 4 mg/kg, administrada diariamente, aumentou a latência de retirada da pata a partir do 14º dia (19,76 %; $P < 0,05$) até o 28º dia (16,12 %; $P < 0,05$) (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 – Efeito da McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente na hiperalgesia mecânica plantar de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

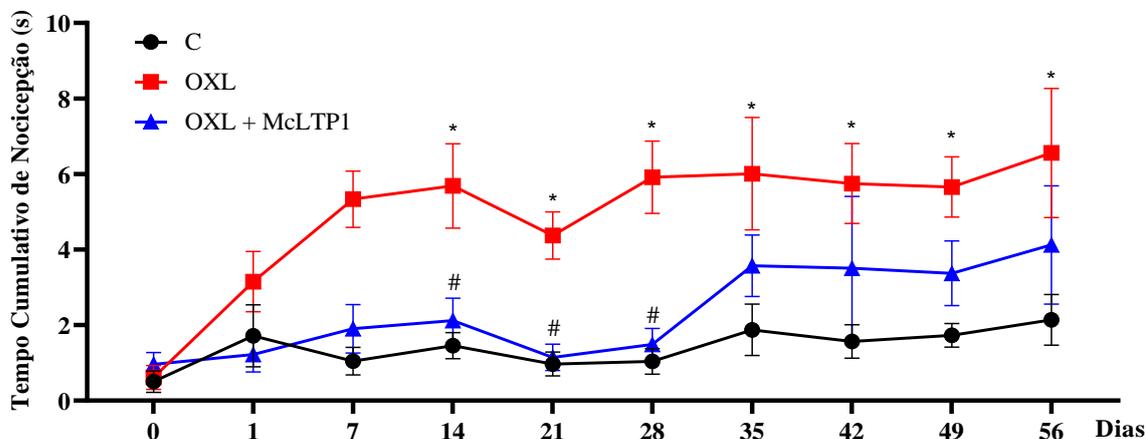


Fonte: dados do estudo. O gráfico representa a progressão da hiperalgesia mecânica plantar em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da latência de retirada da pata em segundos (s) de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$ em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.5 Efeito da McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente na alodínia térmica pelo frio de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

A oxaliplatina aumentou o tempo cumulativo de nocicepção na pata a partir do 14º dia (74,47 %; $P < 0,05$) até o 56º dia (67,32 %; $P < 0,05$), quando comparado com o grupo controle (GRÁFICO 5). A McLTP1 4 mg/kg, administrada diariamente, diminuiu o tempo de nocicepção provocada pela oxaliplatina a partir do 14º dia (62,67%; $P < 0,05$) até o 28º dia (74,95%; $P < 0,05$) (GRÁFICO 5).

Gráfico 5 – Efeito da McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente na alodínia térmica pelo frio de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.



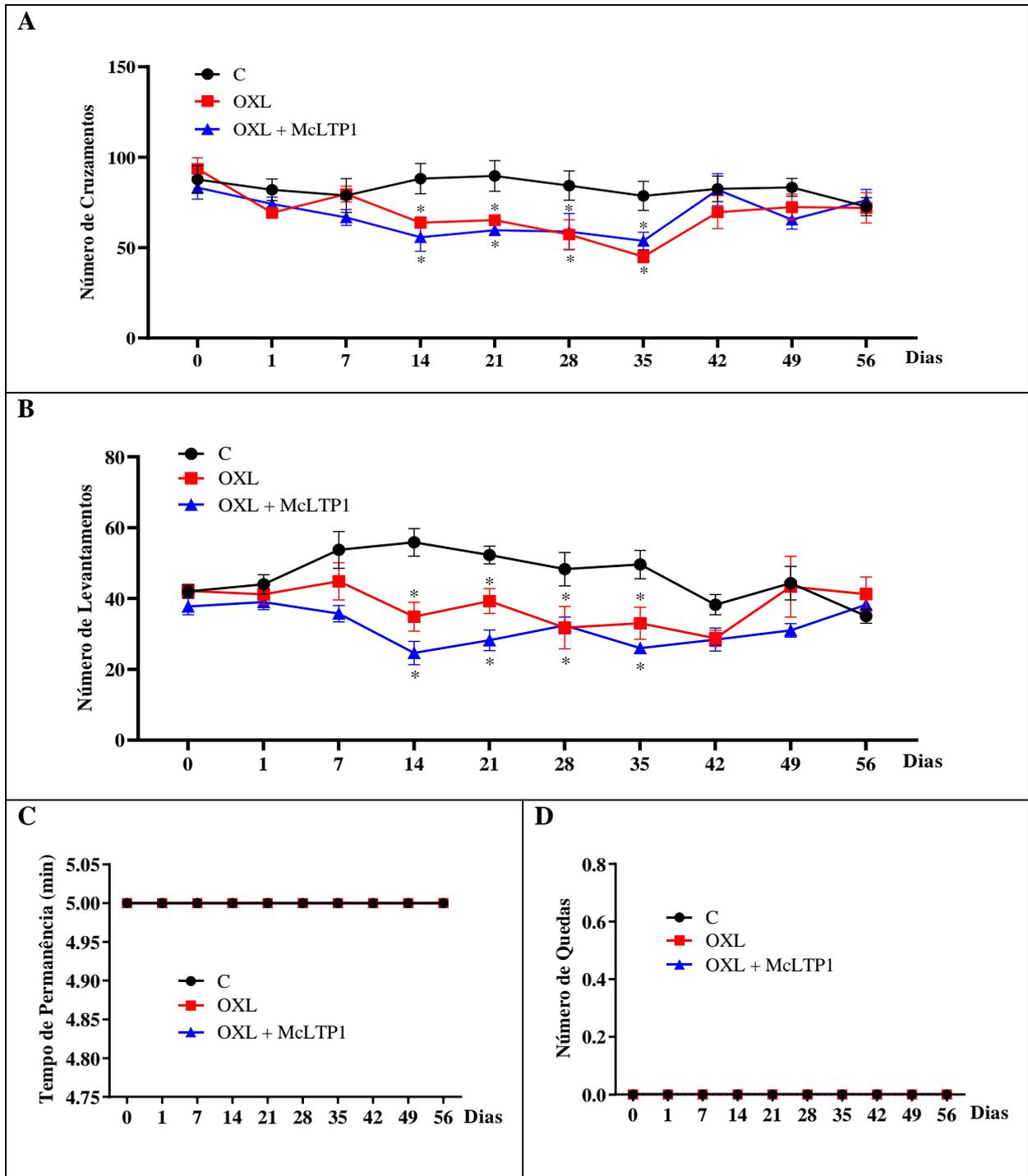
Fonte: dados do estudo. O gráfico representa a progressão da alodínia térmica pelo frio (10°C) no teste da acetona em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do tempo cumulativo de nociceção em segundos (s) de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.6 Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

No teste de campo aberto, a oxaliplatina diminuiu o número de cruzamentos e levantamentos a partir do 14º dia (27,63 % e 16,49 %; $P < 0,05$ e $P < 0,05$, respectivamente) até o 35º dia (42,79 % e 33,46 %; $P < 0,05$ e $P < 0,05$, respectivamente), quando comparado com o grupo controle (GRÁFICO 6, A-B). O tratamento com a McLTP1 4 mg/kg, administrada diariamente, não preveniu essas alterações comportamentais 14º dia até o 35º dia (GRÁFICO 6, A-B).

No teste Rota-Rod, a oxaliplatina, assim como a McLTP1 4 mg/kg/dia dada concomitante com a oxaliplatina, não interferiu no desempenho motor dos camundongos, quando comparado com o grupo controle (GRÁFICO 6, C-D).

Gráfico 6 – Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

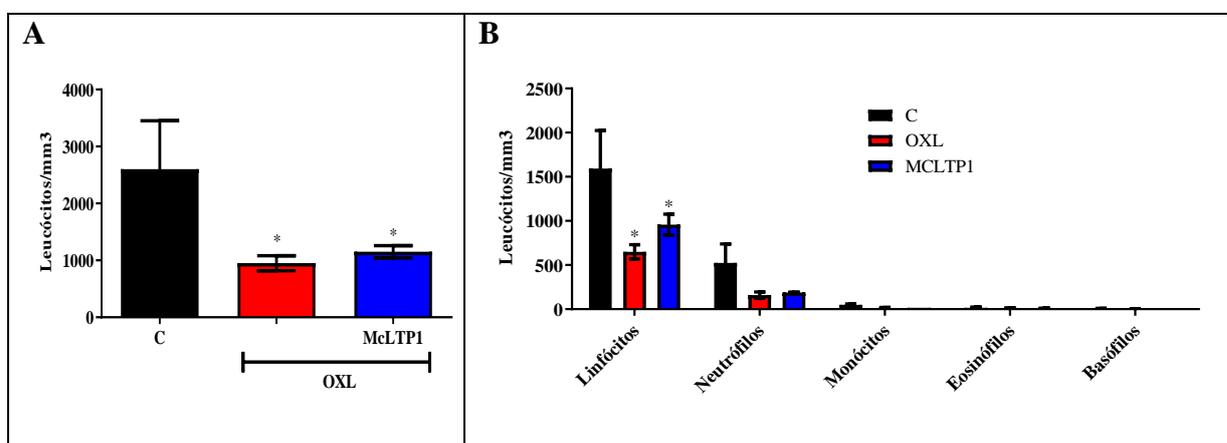


Fonte: dados do estudo. O gráfico representa a progressão dos Análise comportamental e motor do tratamento com McLTP1 em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 mg/kg, vo, diariamente), a partir do teste de campo aberto (teste de Rota Rod) e do teste de atividade motora forçada (teste de Rota Rod). (A): o número de cruzamentos entre os quadrantes da caixa no teste de Campo Aberto; (B): número de levantamentos corporais na caixa, no teste de Campo Aberto; (C): mostra o tempo de permanência em minutos (min) na barra giratória no teste de Rota-Rod; (D): número de quedas da barra giratória no teste de Rota-Rod. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.7 Efeito da McLTP1 (protocolo I) sobre a contagem de leucócitos sanguíneos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

A oxaliplatina provocou uma diminuição significativa do número de células (50,99 %; $P < 0,05$; contagem total; GRÁFICO 7-A) e da contagem diferencial para linfócitos (57,20 %; $P < 0,05$; GRÁFICO 7-B) no 28º dia. A McLTP1 (dose de 4mg/kg, protocolo I), não alterou essa contagem total do número de leucócitos (Contagem total; GRÁFICO 7-A), e nem a contagem diferencial de linfócitos ($P < 0,05$; GRÁFICO 7-B).

Gráfico 7 – Efeito da McLTP1 sobre a contagem total e diferencial de leucócitos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.



Fonte: dados do estudo. O gráfico representa contagem total (A) e diferencial (B) de leucócitos em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de leucócitos/mm³ de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$ em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

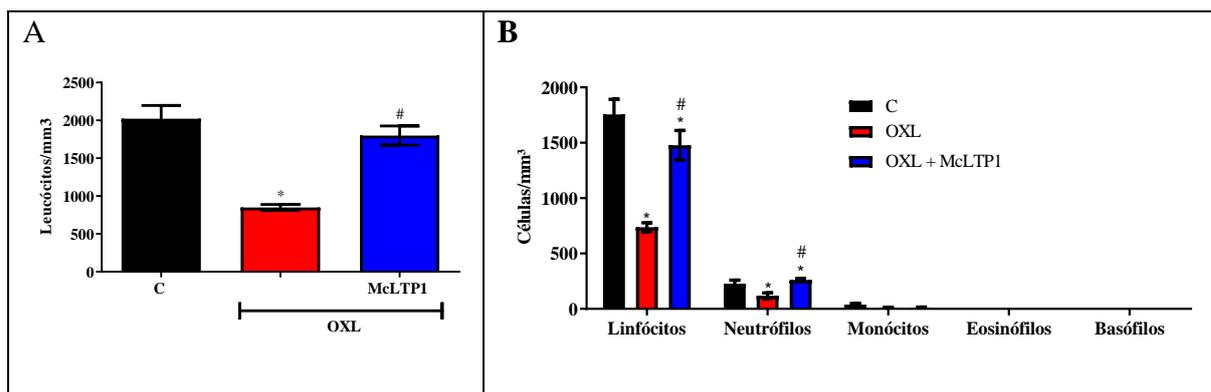
6.8 Efeito da McLTP1 (4 mg/kg – protocolo II), administrada diariamente, sobre a contagem de leucócitos sanguíneos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

A oxaliplatina diminuiu significativamente número total de células (57,96 %; $P < 0,05$; contagem total; GRÁFICO 8-A) e contagem diferencial para linfócitos (58,02%; $P < 0,05$; GRÁFICO 8-B).

A administração de McLTP1 (4 mg/kg, diariamente) foi capaz de prevenir a redução do número total de leucócitos provocada pela oxaliplatina ($P < 0,05$), revertendo em 47 % esse efeito (GRÁFICO 8-A). Na contagem diferencial a McLTP1 também preveniu a redução do número de linfócitos em 42,2 % ($P < 0,05$; GRÁFICO 8-B).

A oxaliplatina também provocou uma diminuição significativa do número de neutrófilos (52,65%; $P < 0,05$, GRÁFICO 8-B). A McLTP1 4 mg/kg dada diariamente, foi capaz de prevenir de forma significativa a diminuição do número de neutrófilos sanguíneos (62,83%; $P < 0,05$, GRÁFICO 8-B).

Gráfico 8 – Efeito da McLTP1 administrada diariamente sobre a contagem total e diferencial de leucócitos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.



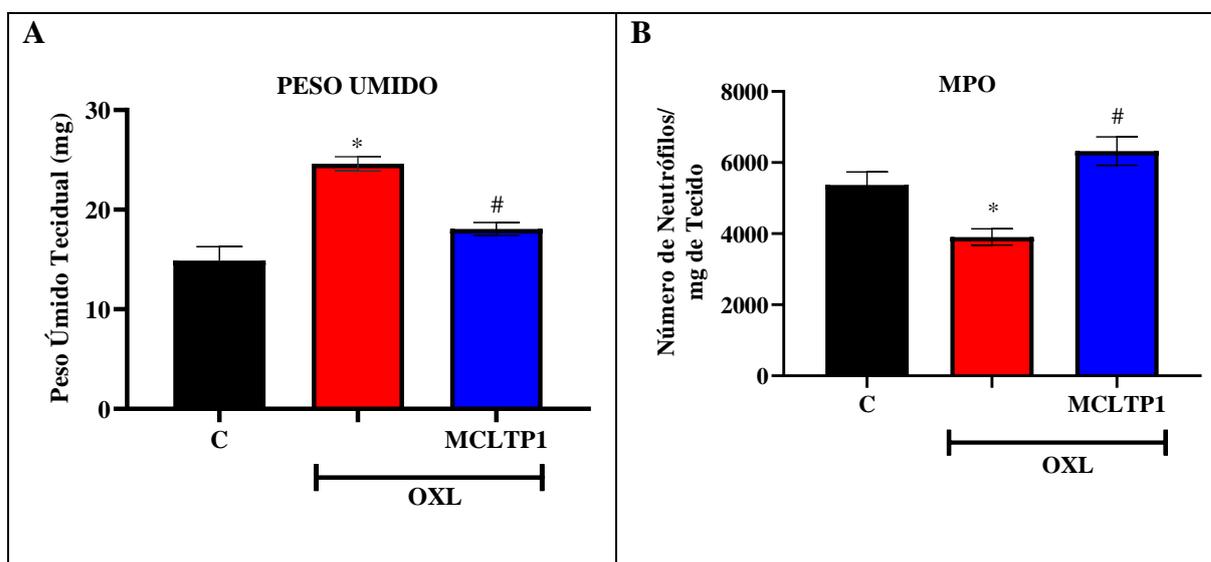
Fonte: dados do estudo. O gráfico representa contagem total (A) e diferencial (B) de leucócitos em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de leucócitos/mm³ de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$ em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.9 Efeito da McLTP1 (4 mg/kg Protocolo II), administrada diariamente, sobre os neutrófilos teciduais de nervos ciáticos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

A oxaliplatina provocou um aumento significativo do peso úmido tecidual (65,32%; $P < 0,05$; GRÁFICO 9-A) e uma diminuição significativa do número de neutrófilos por miligrama de tecido de nervo ciático (27,63%; $P < 0,05$; GRÁFICO 9-B), respectivamente.

O tratamento com McLTP1 4 mg/kg, foi capaz de prevenir de forma significativa o aumento do peso úmido tecidual em 43,89% ($P < 0,05$; GRÁFICO 9-A), e a redução do número de neutrófilos por miligrama de tecido de nervo ciático em 45,80% ($P < 0,05$, GRÁFICO 9-B).

Gráfico 9 – Efeito da McLTP1 sobre neutrófilos teciduais (nervo ciático) e sanguíneos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.



Fonte: dados do estudo. O gráfico representa o peso úmido tecidual de nervos ciáticos bilaterais (A) e a dosagem de MPO (Mieloperoxidase) de nervos ciáticos bilaterais (B) em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de Neutrófilos/mm³ de 8 animais por grupo. *P < 0,05, em relação C; #P < 0,05 em relação OXL (ANOVA de uma via, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.10 Avaliação da participação de receptores TRPA1 e TRPM8 no efeito antinociceptivo da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

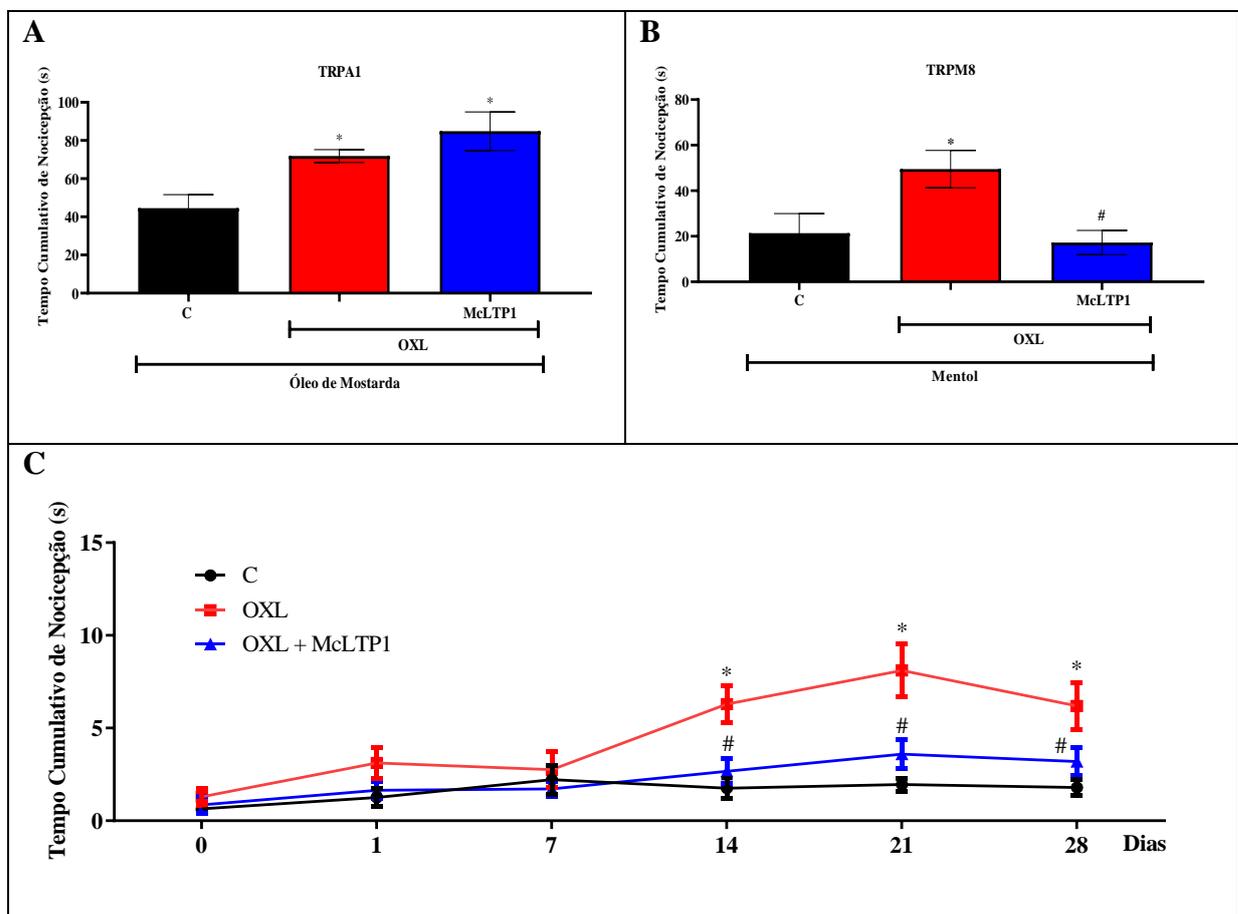
No 14^o dia de experimento, após a confirmação da instalação da neuropatia por oxaliplatina, avaliada pelo teste da acetona (GRÁFICO 9-C), foram administrados agonistas dos receptores TRPA1 (óleo de mostarda) e TRPM8 (mentol) por via intraplantar nos grupos controle, oxaliplatina e McLTP (4 mg/kg) + Oxaliplatina. Os resultados mostraram um aumento significativo do comportamento nociceptivo somatório ou tempo cumulativo de nocicepção (s) no grupo tratado com a oxaliplatina para ambos os agonistas (37,95 % e 56,82; P < 0,05 e P < 0,05, respectivamente) em comparação com o grupo controle (GRÁFICO 9-A).

A McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente mais a oxaliplatina, foi capaz de prevenir o aumento do comportamento nociceptivo somatório provocada pela oxaliplatina somente para o mentol (agonista TRPM8; em 65,15%; P < 0,05), mas não para o óleo de mostarda (agonista TRPA1; GRÁFICO 9, A-B).

Para controle da instalação da neuropatia sensitiva periférica da oxaliplatina e verificação do efeito antinociceptivo da McLTP1 os grupos passaram pelo teste da acetona

antes da administração dos agonistas, onde foi confirmado efeito da oxaliplatina com o aumento do tempo de nocicepção a partir do 14º dia ($P < 0,05$) até o 28º dia ($P < 0,05$), quando comparado com o grupo controle (GRÁFICO 9-C). Confirmou-se também o efeito antinociceptivo da McLTP1, a partir do 14º dia ($P < 0,05$) até o 28º dia ($P < 0,05$; GRÁFICO 9-C).

Gráfico 10 – Participação dos receptores TRPA1 e TRPM8 no efeito antinociceptivo da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.



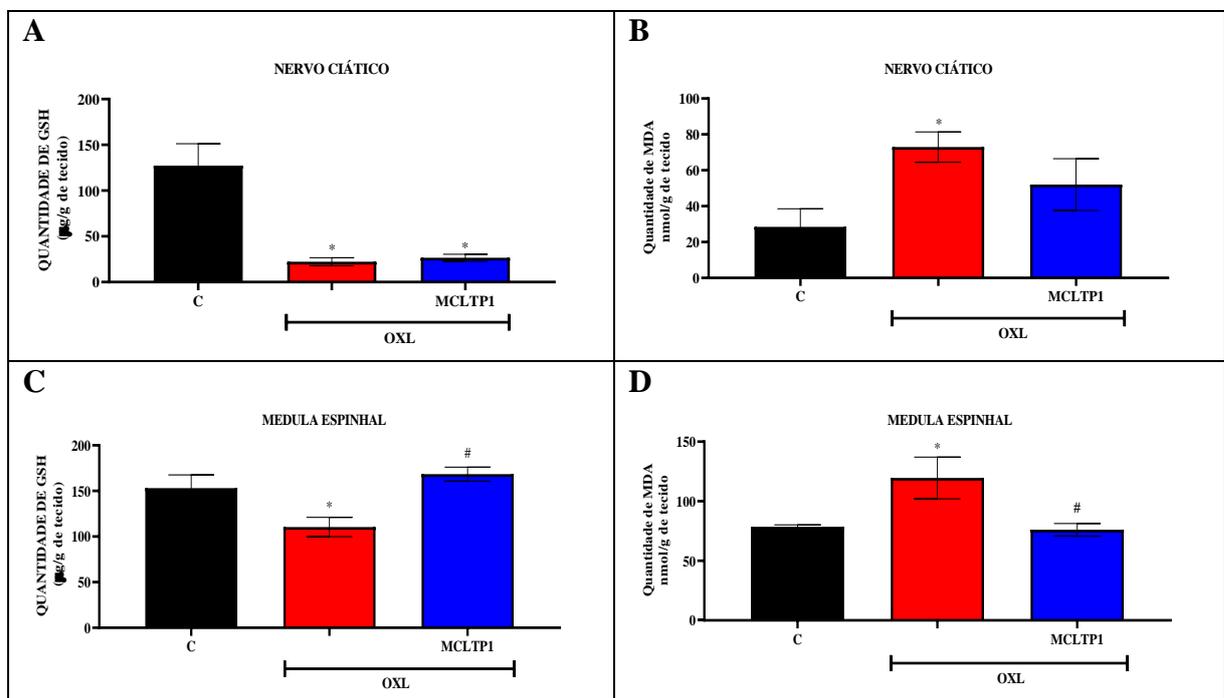
Fonte: dados do estudo. O gráfico representa a progressão do possível envolvimento dos receptores TRPA1 e TRPM8 e da alodínia térmica pelo frio provocado pela acetona (10°C), a partir da administração intraplantar dos agonistas óleo de mostarda (TRPA1) e mentol (TRPM8) em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). (A): Tempo cumulativos de nocicepção provocada pela administração de oxaliplatina e o agonista TRPM8; (B): Tempo cumulativos de nocicepção provocada pela administração de oxaliplatina e o agonista TRPA1; (C): Acompanhamento da progressão da alodínia térmica pelo frio. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do tempo cumulativo de nocicepção em segundos (s) de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$, em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.11 Efeito da McLTP1 nos níveis de malondialdeído (MDA) e Glutathiona reduzida (GSH).

A oxaliplatina provocou uma diminuição significativa nos níveis de GSH no nervo ciático (82,53 %; $P < 0,05$) e na medula espinal (27,84 %; $P < 0,05$) em comparação com o grupo controle (GRÁFICO 10, A-C). A McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente foi capaz de prevenir a diminuição de GSH na medula espinal (37,88 %; $P < 0,05$), mas não no nervo ciático (GRÁFICO 10, A-C).

A oxaliplatina também provocou um aumento significativo do MDA no nervo ciático (60,97 %; $P < 0,05$) e na medula espinal (34,27 %; $P < 0,05$) em comparação com o grupo controle (GRÁFICO 10, B-D). A McLTP1 foi capaz de prevenir o aumento de MDA na medula espinal (36,33 %; $P < 0,05$), mas não no nervo ciático (GRÁFICO 10, B-D).

Gráfico 11 – Efeito da McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente no estresse oxidativo em camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina, a partir da avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA) e Glutathiona reduzida (GSH).



Fonte: dados do estudo. O gráfico representa quantidade de GSH no nervo ciático (A), a quantidade de MDA no nervo ciático (B), a quantidade de GSH na medula espinal (L3-L5) (C) e a quantidade de MDA na medula espinal (L3-L5) (D) a partir da administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e tratados com McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da quantidade de GSH ou MDA em mg/g de tecido de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$, em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

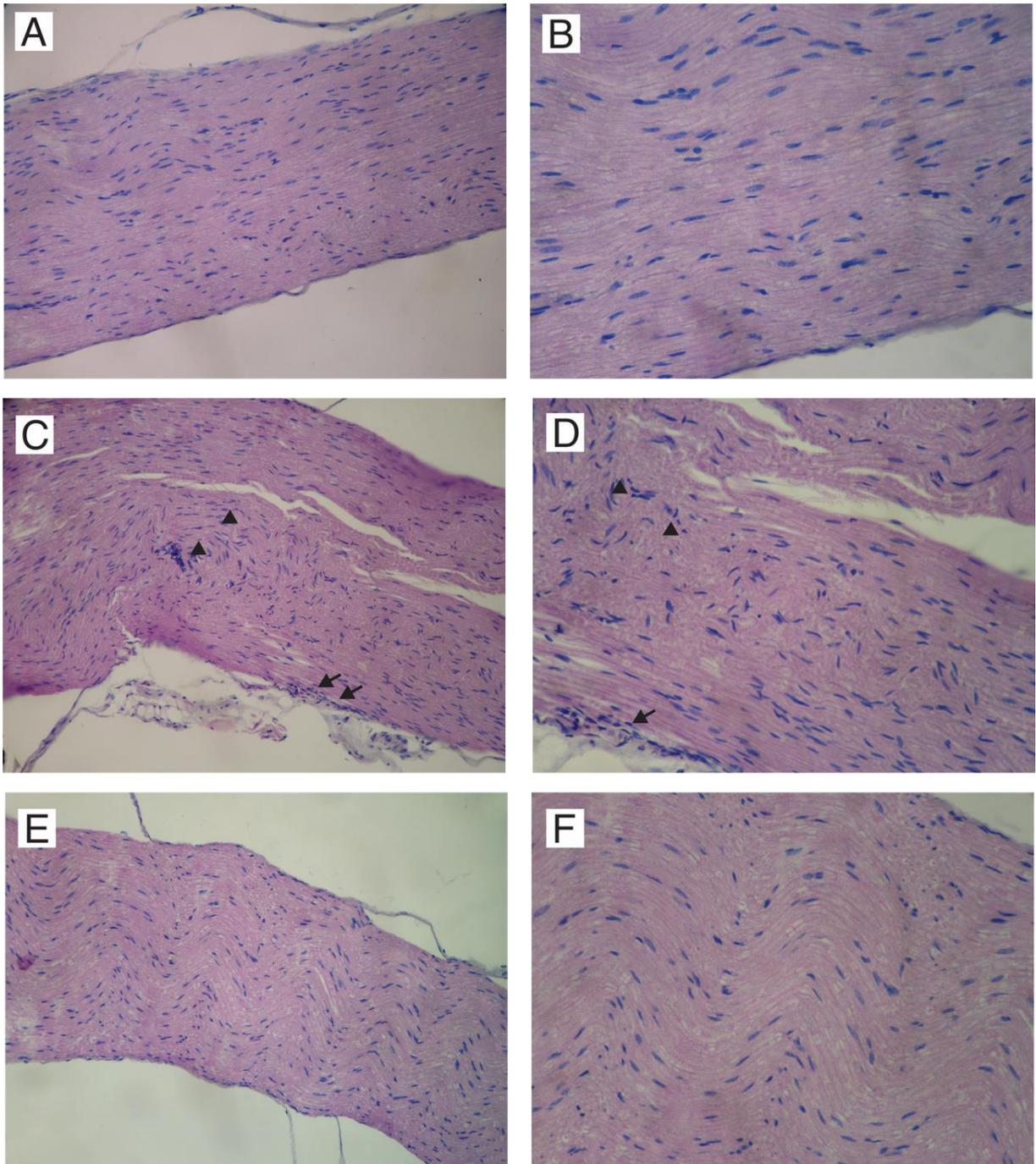
6.12 Análise histológica do efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, em nervos ciáticos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

A análise histológica dos nervos ciáticos mostrou no grupo controle fibras nervosas longitudinais íntegras, onde se visualizam axônio, bainha de mielina, núcleos arredondados correspondendo às células de Schwann. Nas duas extremidades observam-se trechos com fibras em corte transversal onde se vê axônio mielínico. Há núcleos fusiformes sugestivos de fibrócitos do tecido conjuntivo do endoneuro. Em área focal, há remanescente de perineuro. Na avaliação através de escores deste grupo obteve mediana 1 (1-1) (Tabela 1; FIGURA 9, A-B).

No grupo da oxaliplatina, a avaliação por escores obteve mediana 3 com valores que variaram de 2 a 4 (Tabela 1). Neste grupo observou-se fibras nervosas longitudinais íntegras onde se visualizam axônio, bainha de mielina, núcleos arredondados correspondendo às células de Schwann, mostrando ora trechos de hiper celularidade ora de desorganização das fibras nervosas com aparência pálida. Em uma das extremidades observam-se fibras em corte transversal onde se vê axônio mielínico. Há núcleos fusiformes sugestivos de fibrócitos do tecido conjuntivo do endoneuro. Em área focal, há remanescente de perineuro e foco de células inflamatórias mononucleares (FIGURA 9, C-D).

No grupo que recebeu oxaliplatina mais McLTP1 (4mg/kg, diariamente), a avaliação por escores obteve mediana 2 e valores que variaram de 2 a 2 (Tabela 1). Neste grupo observou-se fibras nervosas longitudinais íntegras, onde se visualizam axônio, bainha de mielina, núcleos arredondados correspondendo às células de Schwann, mostrando trechos de exuberante disposição ondulada. Nas extremidades observam-se fibras em corte transversal onde se vê axônio mielínico. Há núcleos fusiformes sugestivos de fibrócitos do tecido conjuntivo do endoneuro. Há remanescente de perineuro e células inflamatórias dispersas, em sua maioria, mononucleares, inclusive dissociando as fibras nervosas (FIGURA 9, E-F).

Figura 9 – Fotomicrografias de nervo ciático de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.



Fonte: Fonte: dados do estudo. (A): Controle 200x; (B): Controle 400x; (C): Oxaliplatina 200x; (D): Oxaliplatina 400x; (E) McLTP1 mais oxaliplatina (4mg/kg, diariamente) 200x; (F): McLTP1 mais oxaliplatina (4mg/kg, diariamente) 400x. Setas indicam foco de células inflamatórias mononucleares e ponta de seta indicam áreas de hiper celularidade e desorganização de fibras. Hematoxilina e eosina. McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

Tabela 1 – Escores de análise histológica dos nervos ciáticos de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.

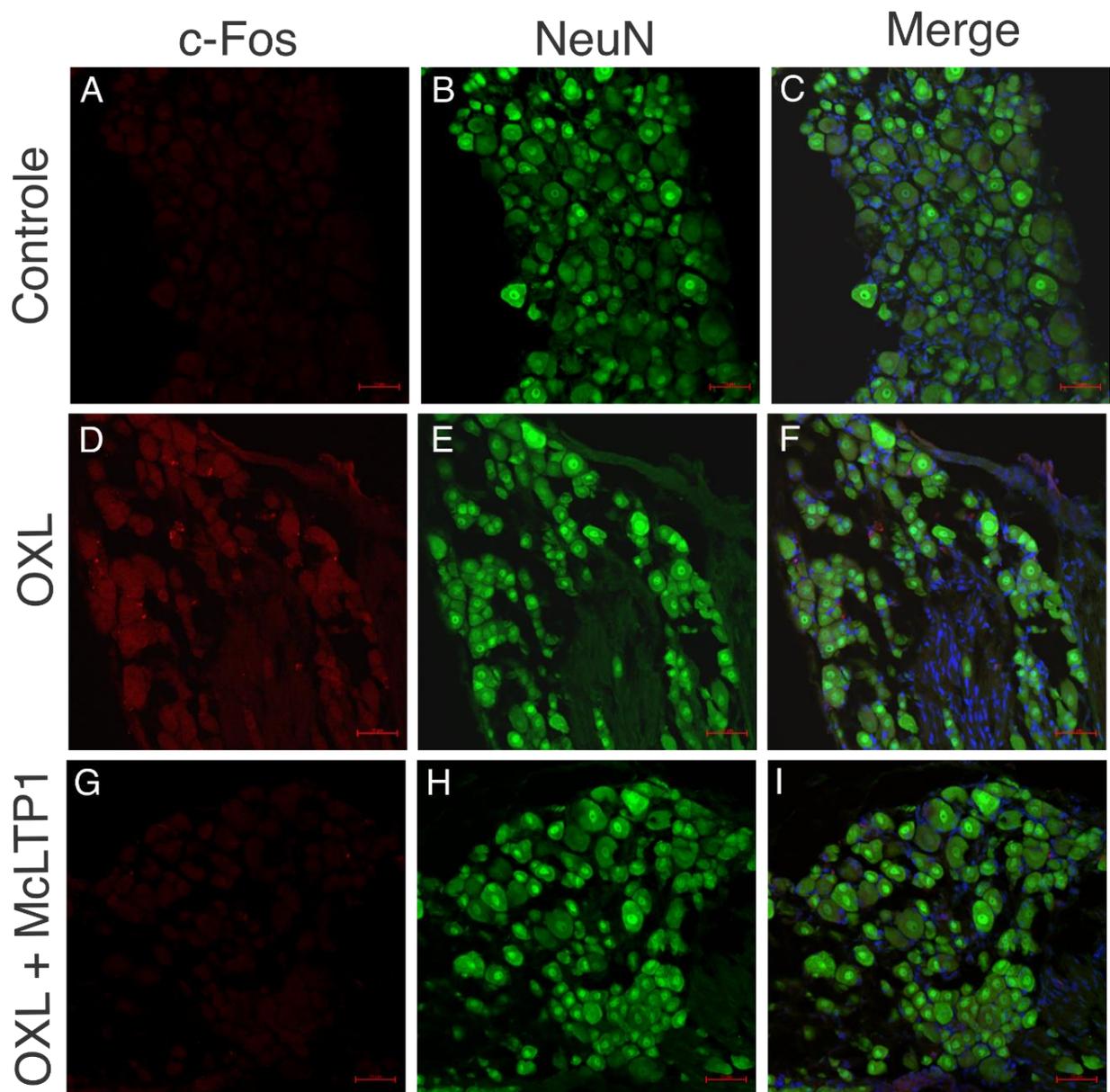
Grupos	Mediana (variação dos escores)
C	1 (1 - 1)
OXL	3 (3 - 4)*
OXL + McLTP1	2 (2 - 2)*#

Fonte: dados do estudo. A tabela expressa os escores da análise histológica dos nervos ciáticos de camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como mediana com variação de mínimo e máximo da mediana dos escores de 8 animais por grupo. * $P < 0,05$, em relação C + V; # $P < 0,05$, em relação OXL (ANOVA de uma via, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); V (veículo da McLTP1); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.13 Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, sobre a expressão de c-Fos no gânglio da raiz dorsal (GRD) e medula espinal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

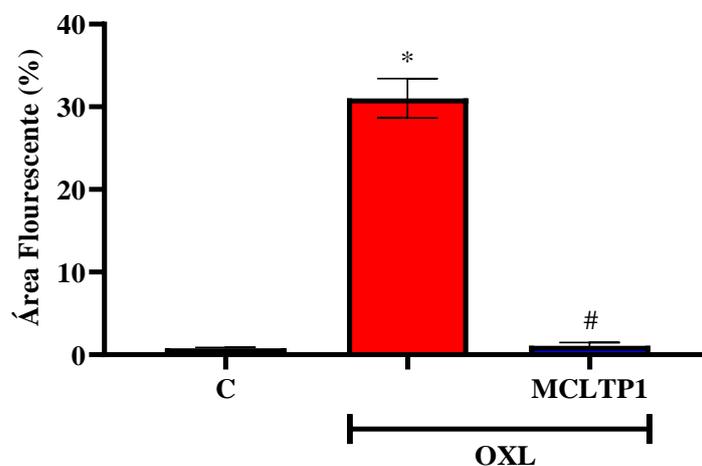
A análise por imunofluorescência para o marcador c-Fos, no gânglio da raiz dorsal (GRD), mostrou que a oxaliplatina provocou um aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão de c-Fos, avaliada pela área marcada ($31,03 \pm 2,38$ %) em células neuronais no 28º dia experimental, quando comparado com o grupo controle ($0,78 \pm 0,10$ %) (FIGURA 10; GRÁFICO 12). A McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente, mais a oxaliplatina, foi capaz de prevenir o aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão de c-Fos ($1,09 \pm 0,38$ %) em células neuronais no 28º dia experimental, quando comparado com o grupo que recebeu somente oxaliplatina (FIGURA 10; GRÁFICO 12).

Figura 10 – Fotomicrografias da expressão de c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.



Fonte: dados da pesquisa. Marcador verde: NeuN (marcador corpo celular de neurônios; alexa flúor 488); Marcador vermelho: c-Fos (marcador de ativação neuronal - gene de ativação imediata; Alexa flúor 568); Marcador azul: DAPI (marcador nuclear); Merge: co-localização c-Fos+NeuN+DAPI. Aumento: 200 x. Escala: 50 μ m. Os gânglios da raiz dorsal (L3-L5) foram coletados no 28º dia experimental dos grupos: controle (A, B e C), Oxaliplatina (D, E e F) e oxaliplatina com McLTP1 (G, H e I). Abreviações: OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

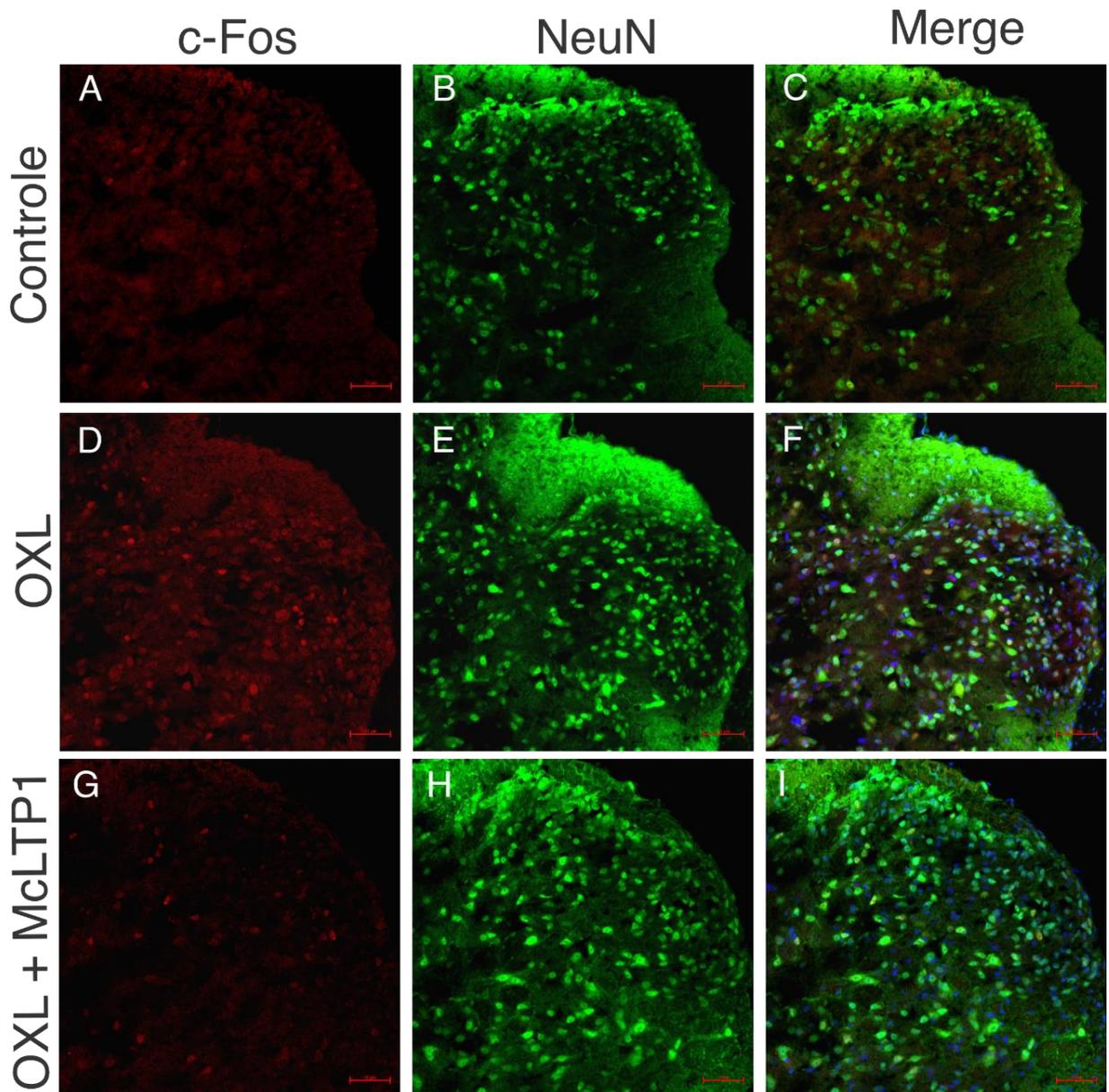
Gráfico 12 – Quantificação da área fluorescente da expressão de c-Fos em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.



Fonte: dados do estudo. O gráfico apresenta a área fluorescente positiva da expressão de c-Fos em relação a expressão de NeuN em gânglio da raiz dorsal (GRD) de camundongos, no 28º dia experimental, a partir da administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da porcentagem da área fluorescente positiva para 6 fotos (de animais diferentes) por grupo experimental. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$, em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

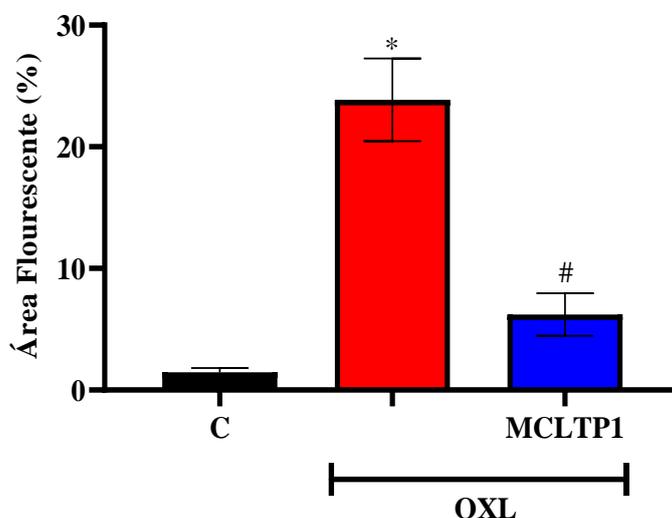
A análise por imunofluorescência para o marcador c-Fos, na medula (segmento L3-L5), mostrou que a oxaliplatina provocou um aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão de c-Fos ($23,86 \pm 3,39$ %) em células neuronais no 28º dia experimental, quando comparado com o grupo controle ($1,45 \pm 0,34$ %) (FIGURA 11; GRÁFICO 13). A McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente, mais a oxaliplatina, foi capaz de prevenir o aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão de c-Fos ($6,20 \pm 1,76$ %) em células neuronais no 28º dia experimental, quando comparado com o grupo que recebeu somente oxaliplatina (FIGURA 11; GRÁFICO 13).

Figura 11 – Fotomicrografia da expressão de c-Fos em medula espinal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.



Fonte: dados da pesquisa. Marcador verde: NeuN (marcador corpo celular de neurônios; alexa flúor 488); Marcador vermelho: c-Fos (marcador de ativação neuronal - gene de ativação imediata; Alexa flúor 568); Marcador azul: DAPI (marcador nuclear); Merge: co-localização c-Fos+NeuN+DAPI. Aumento: 200 x. Escala: 50 μ m. A medula espinal (segmento L3-L5) foram coletados no 28^o dia experimental. Controle (A, B e C), oxaliplatina (D, E e F) e oxaliplatina com McLTP1 (G, H e I). Abreviações: OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

Gráfico 13 – Quantificação da área fluorescente da expressão de c-Fos em medula espinal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.

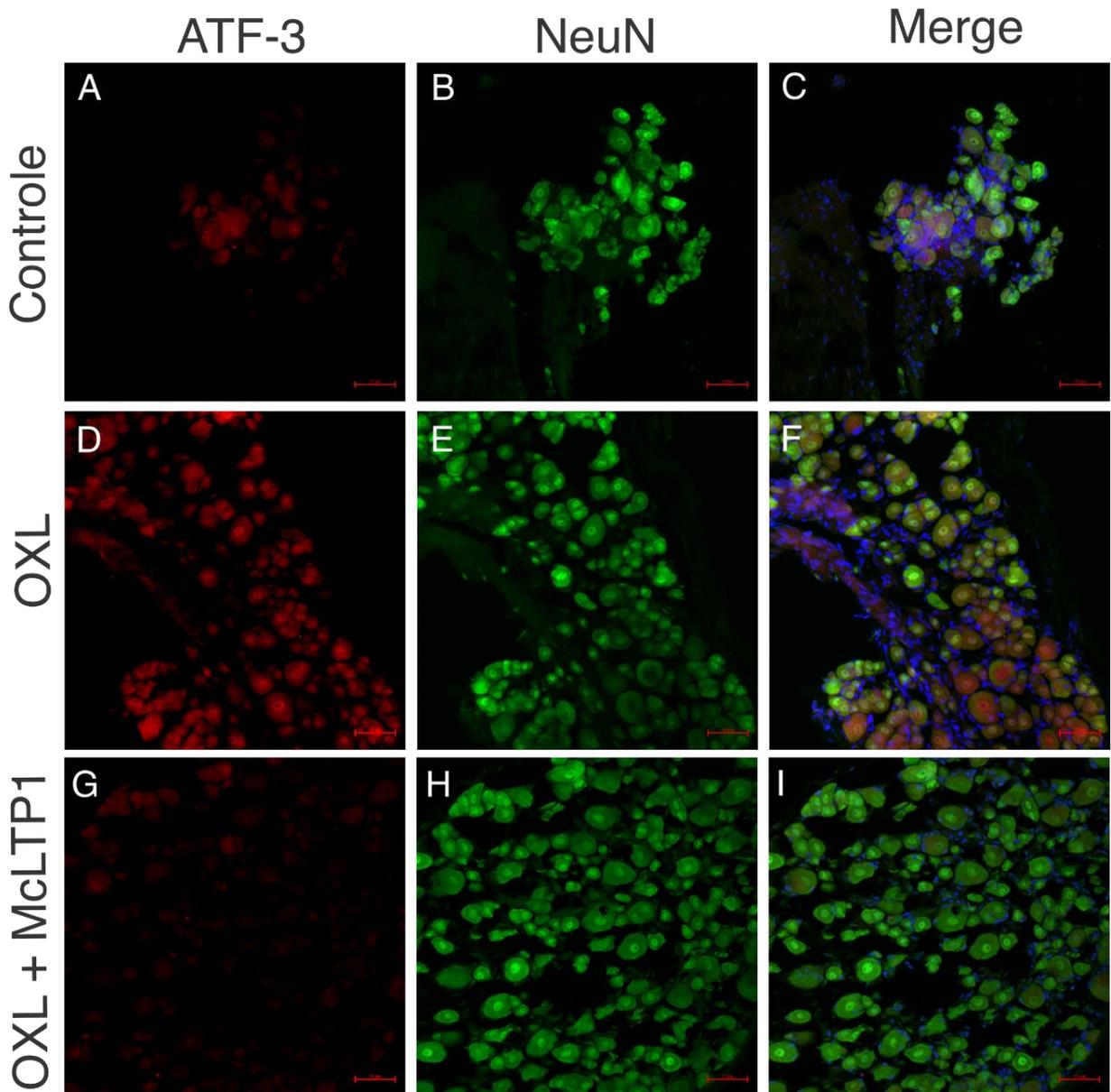


Fonte: dados do estudo. O gráfico apresenta a área fluorescente positiva da expressão de c-Fos em relação a expressão de NeuN na medula espinal de camundongos, no 28º dia experimental, a partir da administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da porcentagem da área fluorescente positiva para 6 fotos (de animais diferentes) por grupo experimental. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$, em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.14 Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, sobre a expressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal (GRD) de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

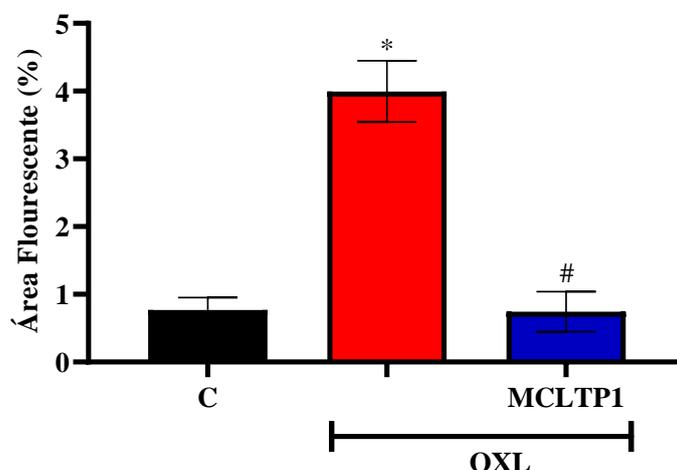
A análise por imunofluorescência para o marcador ATF-3, no gânglio da raiz dorsal (GRD), mostrou que a oxaliplatina provocou um aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão de ATF-3 ($3,99 \pm 0,45$ %) em células neuronais no 28º dia experimental, quando comparado com o grupo controle ($0,76 \pm 0,18$ %) (FIGURA 12; GRÁFICO 14). A McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente mais a oxaliplatina, foi capaz de prevenir o aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão de ATF-3 ($0,74 \pm 0,29$ %) em células neuronais no 28º dia experimental, quando comparado com o grupo que recebeu somente oxaliplatina (FIGURA 12; GRÁFICO 14).

Figura 12 – Fotomicrografias da expressão de ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1 e tratados com McLTP1.



Fonte: dados da pesquisa. Marcador Verde: NeuN (marcador neuronal); Marcador vermelho: ATF-3 (marcador de regeneração após lesão de neurônios do gânglio da raiz dorsal); Marcador azul: DAPI (marcador nuclear); Merge: co-localização ATF-3+NeuN+DAPI. Aumento: 200 x. Escala: 50 μ m. Os gânglios da raiz dorsal (L3-L5) foram coletados no dia experimental 28. Controle (A, B e C), Oxaliplatina (D, E e F) e oxaliplatina com McLTP1 (G, H e I).. Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

Gráfico 14 – Quantificação da área fluorescente da expressão de ATF-3 em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.

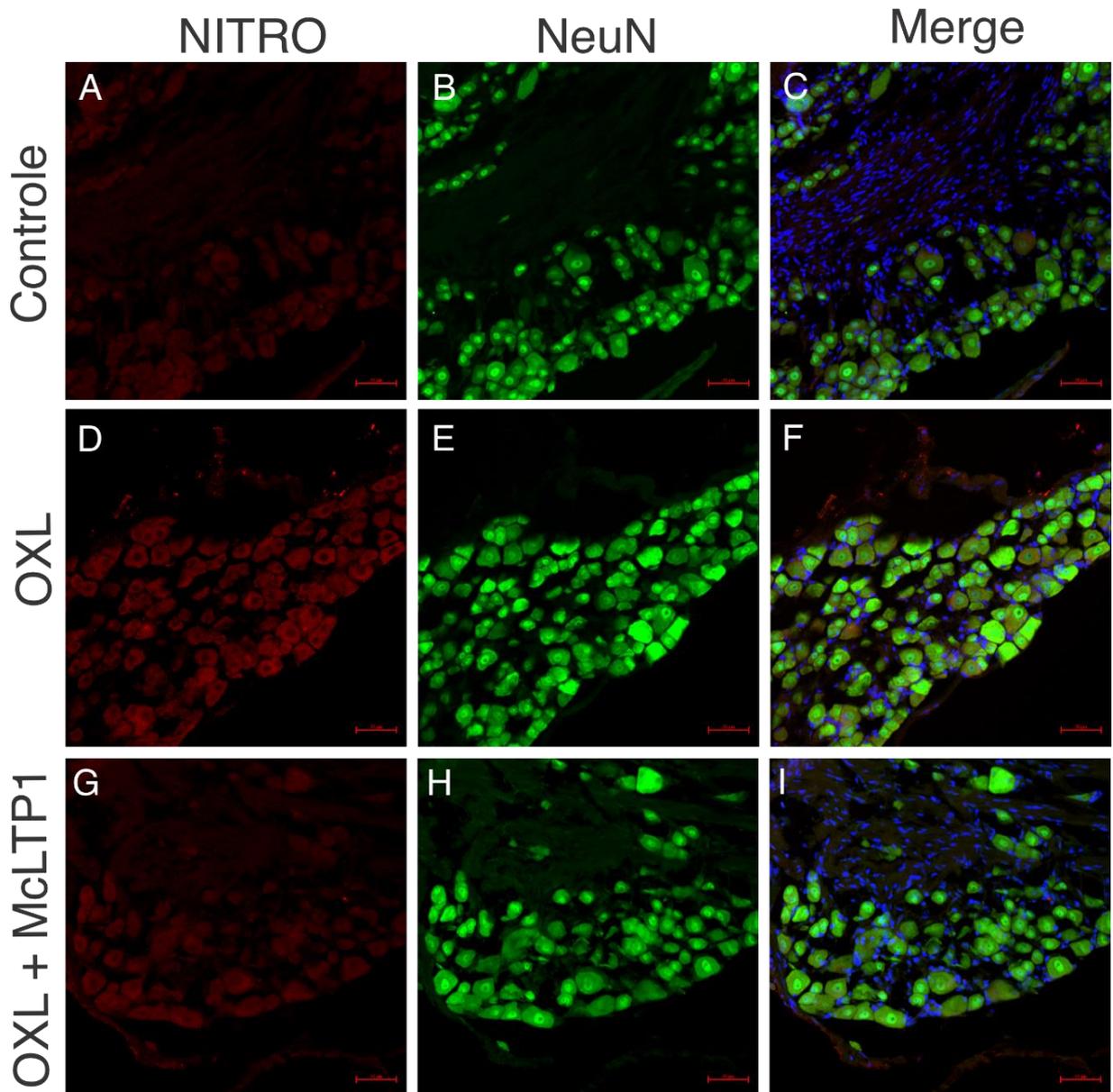


Fonte: dados do estudo. O gráfico apresenta a área fluorescente positiva da expressão de ATF-3 em relação a expressão de NeuN em gânglio da raiz dorsal de camundongos, no dia experimental 28, a partir da administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da porcentagem da área fluorescente positiva para 6 fotos (de animais diferentes) por grupo experimental. * $P < 0,05$, em relação C; # $P < 0,05$, em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

6.15 Efeito da McLTP1 (4 mg/kg), administrada diariamente, sobre a expressão de nitrotirosina no gânglio da raiz dorsal (GRD) de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina.

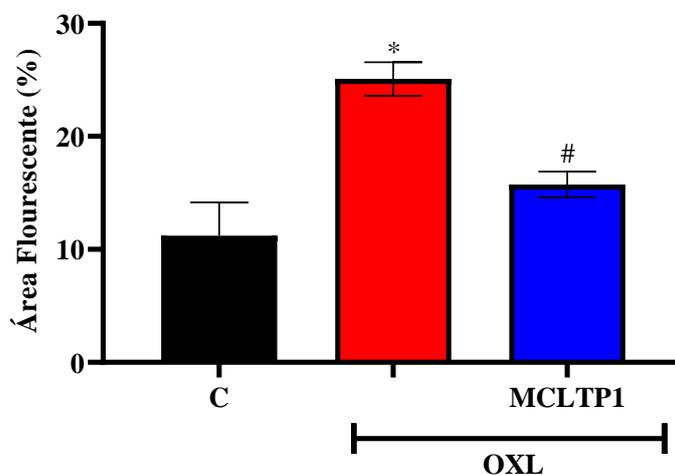
A análise por imunofluorescência para o marcador nitrotirosina, no gânglio da raiz dorsal (GRD), mostrou que a oxaliplatina provocou um aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão de nitrotirosina ($25,08 \pm 1,48$ %) em células neuronais no 28º dia experimental, quando comparado com o grupo controle ($11,22 \pm 2,94$ %) (FIGURA 13; GRÁFICO 15). A McLTP1 4 mg/kg administrada diariamente mais a oxaliplatina, foi capaz de prevenir o aumento significativo ($P < 0,05$) da expressão de nitrotirosina ($15,75 \pm 1,14$ %) em células neuronais no 28º dia experimental, quando comparado com o grupo que recebeu somente oxaliplatina (FIGURA 13; GRÁFICO 15).

Figura 13 – Fotomicrografias da expressão de nitrotirosina em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.



Fonte: dados da pesquisa. Marcador Verde: NeuN (marcador neuronal); Marcador vermelho: nitrotirosina (NITRO; marcador de oxidação ou estresse oxidativo dependente de óxido nítrico); Marcador azul: DAPI (marcador nuclear); Merge: co-localização NITRO+NeuN+DAPI. Aumento: 200 x. Escala: 50 μ m. Os gânglios da raiz dorsal (L3-L5) foram coletados no dia experimental 28. Controle (A, B e C), Oxaliplatina (D, E e F) e oxaliplatina com McLTP1 (G, H e I). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

Gráfico 15 – Quantificação da área fluorescente da expressão de nitrotirosina em gânglio da raiz dorsal de camundongos submetidos à NSP por oxaliplatina e tratados com McLTP1.



Fonte: dados do estudo. O gráfico apresenta a área fluorescente positiva da expressão de nitrotirosina em comparação com a expressão de NeuN em gânglio da raiz dorsal de camundongos, no dia experimental 28, a partir da administração crônica de oxaliplatina (2 mg/kg, iv) e McLTP1 (4 mg/kg, vo, diariamente). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da porcentagem da área fluorescente positiva para 6 fotos (de animais diferentes) por grupo experimental. *P < 0,05, em relação C; #P < 0,05, em relação OXL (ANOVA de duas vias, pós-teste de múltiplas comparações de Tukey). Abreviações: C (controle); OXL (oxaliplatina); McLTP1 (Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*).

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado a participação da McLTP1 na neuromodulação da neuropatia sensitiva periférica induzida pelo antineoplásico oxaliplatina em camundongos. Foi observado uma ação neuropreventiva, antinociceptiva, antioxidante, na diminuição de marcadores de danos e nocicepção, e na prevenção da leucopenia, que tenham promovido essa ação neuromoduladora.

A ação desse composto natural nesse modelo torna-se importante, tendo em vista que, o interesse e a busca por compostos derivados de plantas têm aumentado em todo o mundo e tem sido empregado atualmente em terapias modernas no tratamento do câncer (KINTZING; FILSINGER INTERRANTE; COCHRAN, 2016). Apesar da maioria das pesquisas explorar os metabólitos e derivados naturais como agentes terapêuticos anticancerígenos ou neuroprotetores, as proteínas têm apresentado benefícios sobre os compostos metabólicos, sendo um desses benefícios, as interações de ligação mais específicas das proteínas, reduzindo o potencial de ações fora do alvo (LEADER; BACA; GOLAN, 2008).

Diante de uma variedade de modelos na literatura, para o estudo da neuropatia associada a oxaliplatina, a escolha da dose de 2 mg/kg (0,1ml/10g; i.v.) e o método (2x/semana, por 9 semanas) para indução da neuropatia por oxaliplatina foi realizada pautada em alguns experimentos realizados pelo nosso grupo de acordo com os estudos de Pontes (2009), Pereira (2015), Pontes, Lino, Vale (2018), Pereira et al. (2018). A escolha dessa dose faz equivalência a aproximadamente 75mg/m² por ciclo, apresentando uma dose cumulativa variando de 665mg/m² a 680mg/m², considerada uma dose baixa necessária para provocar neuropatia sensitiva crônica por oxaliplatina, o que por sua vez minimiza os danos tóxicos aos animais pelas altas dosagens, e torna possível estudar melhor a progressão da neuropatia (SAIF; REARDON, 2005; ALEJANDRO et al., 2013; ZHOU et al., 2021).

A escolha dessa dose baixa necessária para provocar neuropatia, também leva em consideração a saúde animal que deve ser estimada ao usar modelos com animais de neuropatia induzida por quimioterápicos por razões éticas e de viabilidade prática. Além disso, os comportamentos semelhantes à dor ficam difíceis de serem avaliados com precisão se os animais estão doentes/letárgicos, como resultado da toxicidade sistêmica, pois podem não responderem à estimulação nas patas de forma adequada (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017).

O modelo de neuropatia desse estudo envolve apenas administração isolada de oxaliplatina na ausência de carga tumoral, como na maioria dos modelos de neuropatia por

quimioterápicos (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017). Apesar que os modelos com tumor possam ser considerados clinicamente mais relevantes, as questões práticas disso não devem ser subestimadas, pois normalmente a quimioterapia é frequentemente administrada após a remoção cirúrgica do tumor para eliminar possíveis micro-metástases. Por isso modelar a neuropatia com administração de quimioterapia sozinha é uma abordagem válida (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017).

Diante do modelo e dose, os resultados do estudo mostram que os comportamentos nociceptivos na hiperalgesia mecânica e na alodínia ao frio na neuropatia provocados pela oxaliplatina, apresentam-se em sua fase inicial no 14º dia experimental, em seguida, apresenta seu pico no período da dose cumulativa máxima (28º dia experimental - último dia de administração da oxaliplatina) e depois, após o término das injeções, no qual perduram até o 56º dia experimental (último dia avaliado).

Esses dados se correlacionam com a prática clínica, tendo em vista que os pacientes submetidos a quimioterapia oncológica com a oxaliplatina reportam os sintomas nociceptivos/álgicos da neuropatia nos primeiros ciclos, seguindo de forma persistente mesmo após o término da terapia (ARGYRIOU et al., 2012; LOPRINZI, et al., 2014; KOKOTIS et al., 2016).

Os comportamentos nociceptivos provocados pela oxaliplatina nos testes experimentais supracitados também refletem na redução na atividade comportamental/motora (teste de campo aberto) nos mesmos períodos experimentais supracitados. No qual os animais se apresentam mais atáxicos e astênicos, com conseqüente redução na mobilidade, atividade e capacidade exploratória dentro do aparato do teste.

De maneira similar à prática clínica, não foi observado nos animais submetidos a administração de oxaliplatina, nenhuma deterioração no estado geral, nenhuma alteração no trofismo muscular, na coloração, no aspecto da pele e dos pelos, presença de infecção local ou generalizada, nem perda de peso dos animais e nenhum animal em todos os grupos morreu durante o curso do experimento, de forma análoga aos estudos de Ta, Low e Windebank (2009). Nenhuma diferença significativa na perda de peso foi observada entre os grupos de combinação de oxaliplatina e McLTP1 (dados não mostrados).

Na busca pelo efeito neuroprotetor/neuropreventivo da McLTP1, foi administrada de forma intermitente (2x/semana), a dose de 8 mg/kg de maneira concomitante a oxaliplatina, entre os dias experimentais 1º ao 56º. A escolha dessa dose inicial obedeceu a publicações anteriores (CAMPOS, et al., 2013; CAMPOS et al., 2016; LIMA; et al., 2016; CAMPOS et al., 2017; SOUZA et al., 2018), pautada nas variadas respostas positivas apresentadas. Nesta

mesma dose, em testes propedêuticos no modelo de neuropatia usando a oxaliplatina, observou-se um aumento de óbitos dos animais e apresentaram quadros de leucopenia (dados não apresentados).

Em decorrência disso, foi realizado um *screening* decrescente de dose-resposta (4, 2, e 1 mg), para se obter uma melhor resposta sobre o modelo em estudo. A dose de 4 mg/kg foi a única que nos testes de comportamentos nociceptivos táteis e térmicos apresentou atividade significativa do 14° dia ao 28° dia experimental. Entretanto no 35° ao 56° dia experimental, não houve diferença significativa nos comportamentos nociceptivos.

Diante desses resultados iniciais, ao observar o potencial antinociceptivo e neuromodulador da dose escolhida (4 mg/kg) com a administração intermitente, foi prospectado a otimização desse efeito com a administração diária da McLTP1 nos mesmos períodos experimentais do estudo.

Com a administração diária da McLTP1, o mesmo efeito se repete, houve uma atividade antinociceptiva significativa do 14° dia ao 28° dia experimental, porém no 35° ao 56° dia experimental, não foi notado melhora significativa nos comportamentos nociceptivos mecânicos e térmicos. Ou seja, o efeito da McLTP1, ocorreu apenas durante sua administração.

Isso pode ocorrer possivelmente pelo fato da McLTP1 após atingir seu pico de concentração circulante (duas horas após sua administração) manter-se constante por até 12 horas, depois desse período ocorre decréscimo dessa concentração circulante, onde após 24 horas da administração, ocorre completa metabolização de McLTP1. Esse decréscimo na concentração é perceptível também no seu efeito farmacológico, principalmente no seu efeito antinociceptivo, no qual diminui com o passar do tempo, apresentando durante seu pico (1-2 horas após a administração) uma eficácia de quase 86%, após 12 horas, uma eficácia de quase 34% e após 24 horas, não houve eficácia significativa (COSTA, 2016).

Portanto foi considerado importante avaliar seu efeito até 28° dia (último dia de administração concomitante a oxaliplatina e da MCLTP1) nos experimentos posteriores, levando em consideração a busca apenas pelo efeito preventivo e não terapêutico.

Vale ressaltar que mesmo com a administração intermitente ou diária da proteína, nos períodos supracitados, não houve melhora da atividade comportamental reduzida (no campo aberto) provocada pela oxaliplatina. A McLTP1 não preveniu a ação central da oxaliplatina, possivelmente devido sua ação se mostrar mais periférica (CAMPOS, et al., 2013; CAMPOS et al., 2016; LIMA; et al., 2016; CAMPOS et al., 2017; SOUZA et al., 2018), não há estudos que mostram sua ação central. Além disso, vale salientar que o transporte de peptídeos e

proteínas pode não ocorrer, se estas não possuem um sistema de transporte específico na barreira hematoencefálica (BHE) (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011). A oxaliplatina, por sua vez, passa pela BHE devido provocar mudanças nas células endoteliais, e promove grande distribuição de suas moléculas no sistema nervoso central, provocando tanto efeitos depressores do SNC e outras alterações centrais, como pode participar da cronicidade da neuropatia (BRANCA et al., 2018).

O efeito antinociceptivo da McLTP1 na hiperalgesia mecânica e na alodínia ao frio pode possivelmente estar relacionada com seu envolvimento sobre receptores os TRPM8. Esse efeito pôde ser observado quando a McLTP1 preveniu o aumento da nocicepção ao frio, no teste de alodínia ao frio, no qual os receptores TRPM8 estão fortemente ligados (DESCOEUR et al., 2011; NAKAGAWA; KANEKO, 2017). Além disso, a McLTP1 também preveniu o aumento do tempo cumulativo de nocicepção dos animais após a administração do mentol (um agonista dos receptores TRPM8).

Sabe-se que esses receptores perfazem grande parte do processo fisiopatológico, bem como aumenta comportamentos nociceptivos térmicos e aumenta a transmissão nociceptiva da neuropatia associada a oxaliplatina (DESCOEUR et al., 2011; KAWASHIRI et al., 2012; KATO et al., 2014; MIZUNO et al., 2014; USHIO et al., 2012; KATO et al., 2014; MIZUNO et al., 2014). Uma ação sobre esses receptores, portanto, modificam bastante o curso do processo nociceptivo e fisiopatológico dessa condição clínica.

A McLTP1 demonstrou em outro estudo ter ação moduladora sobre os TRPs (TRPV1) (CAMPOS, et al., 2013), sugerindo ter grande influência na atuação sobre alguns receptores dessa classe. Portanto a McLTP1 pode possivelmente estar modulando diretamente o TRPM8, diminuindo a densidade ou a ativação do TRPM8 que é aumentada pela oxaliplatina (KAWASHIRI et al., 2012). Além disso, foi visto que os canais TRPM8 podem mediar ou ser mediados pelo estresse oxidativo além da própria alodinia ao frio induzida pela oxaliplatina (NASSINI et al., 2011). Como a McLTP1 também demonstrou atividade antioxidante, ambas as ações podem estar atuando de forma sinérgica.

A ação antinociceptiva da MCLTP1, possivelmente por TRPM8 pode ser confirmada com a diminuição da expressão de c-Fos, corroborando ainda mais o efeito antinociceptivo. A imunoexpressão de c-Fos nos neurônios do corno posterior da medula espinhal e nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRD) corrobora com a ideia que existe uma ativação da via nociceptiva provocado pela neuropatia da oxaliplatina, visualizado por meio de uma superexpressão de c-Fos nesses neurônios (AZEVEDO et al., 2013; PEREIRA et al., 2019; PEREIRA et al., 2018).

A expressão de c-Fos demonstra a presença de neurônios nocirresponsivos (BULLITT et al., 1992) e pode ser utilizada como meio de monitorar a atividade e resposta a estímulos nociceptivos nocivos persistentes, pois quanto maior o comportamento nociceptivo e a duração, maior é a expressão de c-Fos (PRESLEY et al. 1990; BULLITT et al., 1992; HARRIS, 1998). Esse marcador na monitorização da neuropatia provocada pela oxaliplatina tem grande importância, pois no modelo em estudo, além de ser um estímulo nociceptivo nocivo persistente ou crônico, a expressão dele é aumentado com a exposição a estímulos dolorosos, como mecânicos e térmicos, sendo utilizada como um marcador de ativação neuronal e neuroplasticidade (BULLITT et al., 1992; HARRIS, 1998).

A McLTP1, por sua vez, diminuiu a expressão de c-Fos, corroborando com o efeito antinociceptivo, visto nos testes comportamentais. Essa ação pode se dar devido a possível ação moduladora da McLTP1 sobre os receptores de TRPM8 (BEUKEMA et al., 2018; TAMURA et al., 2019; ULRICH; WISSENBAACH; THIEL, 2020; LEE et al., 2020; XIE et al., 2022), pois sabe-se que a ativação desses receptores estimula e aumenta a expressão de c-Fos pelo influxo de Ca^{2+} (ULRICH; WISSENBAACH; THIEL, 2020).

A ação antinociceptiva da McLTP1 também pode estar relacionada com a ação antioxidante da McLTP1, tendo em vista que o uso de agentes antioxidantes (como vitamina C e E, ácido alfa-lipóico, glutathiona, glutamina, acetilcisteína, acetil-L-carnitina, rutina e quercetina) apresentaram diminuição na nocicepção térmica ou mecânica provocada pela oxaliplatina (AZEVEDO et al., 2013; TOYAMA et al., 2014; SISIGNANO et al., 2014; HERSHMAN et al., 2014; STAROBOVA; VETTER, 2017; KANAT; ERTAS; CANER, 2017; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020; KAWASHIRI et al., 2021).

A diminuição da nocicepção pela ação moduladora do estresse oxidativo da McLTP1, possivelmente esteja atrelada ao fato desta prevenir processo lesivo nervoso pela oxaliplatina, reduzindo, por conseguinte, a estimulação e a transmissão nociceptiva. Essa ação moduladora, pode estar relacionada ao aumento das reservas de GSH e diminuição da peroxidação lipídica (MDA) provocada pela McLTP1 (como mostra os resultados) no nervo ciático e principalmente na medula (que está predominantemente envolvida na transmissão nociceptiva) que conseqüentemente esteja promovendo antinocicepção e neuroproteção. A redução do processo lesivo pôde ser vista na análise histológica e através da redução da marcação neuronal de nitrotirosina pela imunofluorescência.

O aumento da expressão de nitrotirosina em GRD de camundongos submetidos à neuropatia por oxaliplatina corrobora com os estudos de Pereira e colaboradores (2020). Esse marcador é expresso nas células através da reação entre espécies reativas de nitrogênio (RNS)

e oxigênio (ROS) e resíduos de tirosina em proteínas e tem sido amplamente analisada e utilizada como um biomarcador de condições fisiopatológicas mediadas por espécies reativas (YAMAKURA; IKEDA, 2006). Foi observado que na neuropatia induzida por oxaliplatina ocorre aumento da imunexpressão de nitrotirosina como possível mecanismo de ativação e transmissão nociceptiva na hiperalgesia mecânica e alodínia térmica (PEREIRA et al., 2020).

A McLTP1 também diminuiu a expressão de nitrotirosina, corroborando também com o efeito antinociceptivo e antioxidante da mesma. Essa ação moduladora sobre a nitrotirosina em GRD possivelmente ocorreu devido o potencial antioxidante da McLTP1 sobre o GSH e o MDA na medula e em nervo ciático, pois sabe-se que compostos com ação antioxidante, pode modular a expressão de nitrotirosina, a partir da redução da produção de espécies reativas (SILVESTRO et al., 2019). Além disso, a McLTP1 mostrou reduzir a nocicepção na hiperalgesia mecânica e alodínia térmica, onde foi visto que compostos que preveniram o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e alodínia térmica induzida pela oxaliplatina, demonstraram reduzir a expressão de nitrotirosina (PEREIRA et al., 2020)

Sabe-se que a oxaliplatina causa leucopenia nos pacientes no curso da quimioterapia (PALAPINYO et al., 2022). A oxaliplatina, assim como alguns quimioterápicos, são conhecidos por causar efeitos profundos no sistema imunológico, mais notavelmente uma imunossupressão devido à inibição da mieloproliferação (STAROBOVA; VETTER, 2017). Essa ação pode ser ocasionada também devido uma redução significativa nos parâmetros cinéticos celulares, no índice mitótico e proliferativo provocado pela oxaliplatina em vários tipos de células (ALQUDAH et al., 2018). Os resultados desse estudo confirmam essa leucopenia (diminuição de linfócitos e neutrófilos) a partir dos resultados acima, na contagem total e diferencial de leucócitos.

Com a administração diária da McLTP1 (4 mg/kg), foi observado um dado extraordinário, que foi a prevenção da leucopenia nos animais que receberam oxaliplatina. Aspira-se que a McLTP1 nessa dose, ao prevenir a leucopenia (contagem total), e em especial a linfopenia (contagem diferencial), tenha um papel potencial na regulação de parâmetros cinéticos celulares e no controle do índice mitótico e proliferativo, regulando a multiplicação das células linfocitárias a nível fisiológico.

Por outro lado, na dose de 8mg/kg, parece ter um papel leucopênico, pois em outro estudo usando um modelo de sepse, que por sua vez, promove leucocitose, a McLTP1 na dose de 8mg/kg reverteu significativamente a leucocitose (SOUZA et al., 2018). Nesta mesma dose no modelo experimental de neuropatia por oxaliplatina, conforme supracitado, houve um aumento de óbitos dos animais e apresentaram leucopenia (dados não apresentados).

A prevenção da linfopenia, provocada pela McLTP1 pode ter ótima ação na recuperação do processo lesivo tecidual provocada pela neuropatia, como pode ter excelente correlação clínica na melhora da ação antitumoral da oxaliplatina, tendo em vista que, em um estudo envolvendo o aumento de linfócitos, seja ele induzido (IL-15), ou até mesmo por transferência adotiva de linfócitos, ocorreu inibição no crescimento do tumor, bem como houve taxas de sobrevivência significativamente mais longas aos indivíduos submetidos a oxaliplatina (HU et al., 2021).

Além disso, os linfócitos participam ativamente do processo de morte imunogênica provocada pela oxaliplatina, a partir de sua ativação pela ligação com as moléculas de MHC-I que formam de linfócitos específicos para os antígenos antitumorais, aumentando o reconhecimento e a morte celular no microambiente tumoral. Essa ação dos linfócitos, tem recebido cada vez mais atenção como um efeito que se acredita extraordinariamente apoiar a destruição de células tumorais (TESNIERE et al., 2010; LESTERHUIS et al., 2011; HATO et al., 2014; STAROBOVA; VETTER, 2017). O que, para além da ação antinociceptiva e neuroprotetora a McLTP1 pode contribuir para ação sinérgica antitumoral da oxaliplatina no tratamento antineoplásico.

Além da linfopenia, a oxaliplatina também promove outras reações adversas graves que envolvem toxicidades hematológicas, como a neutropenia (LEE; GIANOS; KLAUSTERMEYER, 2017; OTANI; WONG; BANERJI, 2017). Um outro achado importante presente nesse estudo é que a McLTP1 foi capaz de prevenir a neutropenia sanguínea e promover aumento no recrutamento de neutrófilos a nível tecidual (visto pela quantificação de MPO), que podem estar atuando no processo inflamatório local e reparação tecidual decorrente da lesão nervosa provocada pela oxaliplatina.

Essa a ação sobre os neutrófilos pode ter boa correlação clínica, pois quase todos os pacientes com câncer colorretal tratados com oxaliplatina apresentam algum grau de neutropenia e 40% a 50% dos pacientes apresentam neutropenia de grau 3 ou 4 (de acordo com a escala NCI CTCAE 1-4) (KARLSSON; ANDERSSON; JYNGE, 2017) o que pode comprometer os reparos do processo lesivo nervoso provocado pela oxaliplatina.

Sabe-se que os neutrófilos são células imunes inatas com papéis importantes na defesa celular, são as primeiras células da imunidade inata a chegarem em locais com estímulo inflamatório, como para o dano tecidual quanto para o câncer. Entretanto, com a função neutrofílica reduzida, prejudicada ou desregulada pode resultar em aumento de danos teciduais, perda de homeostase, hiperinflamação ou imunossupressão (VYMAZAL et al.,

2021). Como a oxaliplatina diminui essas células, isso explica em parte o envolvimento ou mecanismo de lesão tecidual na neuropatia provocada pela oxaliplatina.

A prevenção da neutropenia provocado pela McLTP1 pode ter grande influência no efeito antitumoral, tendo vista que os neutrófilos são recrutados e infiltrados fortemente para o microambiente tumoral (ZHANG et al., 2014; KAUNISTO et al., 2015; SHOU et al., 2015). Esse recrutamento acontece através da regulação da expressão e liberação de interleucina 18 (IL-18) pelas células tumorais (KAUNISTO et al., 2015) a partir do fator nuclear das células T ativadas (NFAT) (ZHANG et al., 2014; KAUNISTO et al., 2015; SHOU et al., 2015).

Alguns neutrófilos têm efeitos antitumorais no câncer, principalmente os denominados N1 recrutados a partir da interleucina 8 (IL-8) (GIESE; HIND; HUTTENLOCHER, 2019). Ou por outro lado, a ação da McLTP1 pode inibir ou bloquear o NFAT nas células tumorais, consequentemente inibindo a liberação de IL-18 e o recrutamento de neutrófilos, especialmente os da linha N2, que são pró-tumorais (GIESE; HIND; HUTTENLOCHER, 2019).

A McLTP1, ao promover seu efeito antinociceptivo (através do TRPM8), ao mesmo tempo elevar significativamente o número de linfócitos e possivelmente ao aumentar o recrutamento de neutrófilos para os tecidos (antitumorais) através da regulação da expressão e liberação de interleucina 18 (IL-18), a partir do fator nuclear das células T ativadas, sugere-se estar atuando como modulador sobre o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), pois a inibição/bloqueio ou nocaute desse fator provoca esses efeitos, conforme os estudos de Kawashiri et al., (2012) e Caetano et al., (2002), respectivamente.

No GRD por exemplo, a McLTP1 ao promover seu efeito antinociceptivo pode estar promovendo inibição do NFAT bloqueando sua ativação (conversão de NFAT inativo para NFAT ativo) ou impedindo sua translocação para o núcleo, no qual provoca uma interferência na interação com seu promotor nuclear, diminuindo ou inibindo a expressão gênica do RNAm TRPM8 que é aumentada pela oxaliplatina (KAWASHIRI et al., 2012) e consequentemente diminuindo a transmissão nociceptiva por esse transportador que estar fortemente implicado na neuropatia provocada pela oxaliplatina (DESCOEUR et al., 2011; KAWASHIRI et al., 2012; KATO et al., 2014; MIZUNO et al., 2014; USHIO et al., 2012; KATO et al., 2014; MIZUNO et al., 2014). Além disso, o NFAT demonstrou em estudos recentes está fortemente envolvida na dor neuropática induzida por oxaliplatina (LIU et al., 2023).

Nos linfócitos por exemplo, a McLTP1 ao promover seu aumento em número pode estar promovendo inibição do NFAT. A inibição ou deficiência/nocaute (NFAT1^{-/-}) desse fator, principalmente no tipo NFAT1, causa hiperproliferação, aumento das taxas de ciclo celular de linfócitos, com aumento da resposta e atividade de linfócitos T e B, modulando

respostas imunes (XANTHOUDAKIS et al., 1996; HODGE et al., 1996; SCHUH et al., 1998; CAETANO et al., 2002)

Ao sugerir que a McLTP1 atua inibindo ou modulando o NFAT, apresenta como vantagem uma possível ação sinérgica com a oxaliplatina na ação antitumoral, tendo em vista que o NFAT pode estar envolvido na tumorigênese; na regulação de funções biológicas, como o ciclo celular, a proliferação e a apoptose (GAO et al., 2022); na formação e proliferação de tumores sólidos (KAUNISTO et al., 2015; LIU et al., 2013; SHOU et al., 2015; GAO et al., 2022) por induzir a expressão de oncogenes e inibir a expressão de genes supressores de tumor (LIU et al., 2013; SHOU et al., 2015; GAO et al., 2022); e está intimamente relacionado ao crescimento de células tumorais e ao desenvolvimento de malignidades (MARKLIN et al., 2017; ZHANG et al., 2021; RILI et al., 2022); bem como o crescimento e o microambiente de metástases tumorais (WERNECK et al., 2011).

A partir da avaliação histológica de secções de nervo ciáticos, foi possível demonstrar que a OXL foi responsável por causar alterações estruturais no nervo ciático, onde foi possível observar uma desorganização das fibras nervosas, diminuição, afunilamento ou atrofia axonal e aparência pálida, trechos com vacuolizações axonais e de hiper celularidade com presença de células inflamatórias leucocitárias mistas, incluindo células inflamatórias mononucleares ou polimorfonucleares neutrofílicas, além de apresentar áreas focais com remanescente de perineuro e presença de espaços lacunares entre as células neuronais, sugerindo edema.

Esses achados apresentam similaridade com os estudos de Azevedo e colaboradores (2013), no qual foi visto que a oxaliplatina também causou espaços lacunares entre as células neuronais com sugestividade de edema de tecido conjuntivo, diminuição progressiva do tamanho e diâmetro axonais ou afunilamento dos mesmos, sugerindo atrofia de neurônios. Assim como, com os achados nos estudos de Celik e colaboradores (2020), pelo qual observou-se também vacuolizações em axônios, fibras nervosas desorganizadas, irregulares e adelgadas, além de edema de tecido conjuntivo ou em porções axonais.

Diferentes mecanismos podem contribuir e explicar as alterações histológicas causadas pela oxaliplatina nos nervos ciáticos vistas nesse estudo. A própria oxaliplatina cria um microambiente inflamatório e oxidativo, através do dano direto ao tecido pelo seu mecanismo alquilante ou por outras vias, como as relacionadas à hipóxia, TLR-4 e o próprio estresse oxidativo, que favorece o desarranjo e lesão de fibras nervosas e o recrutamento de células leucocitárias (MEYER, 2011; TSUTSUMI, 2014; CELIK, 2020).

Além disso, a axonopatia (diminuição do tamanho e diâmetro, afinamento ou atrofia das fibras nervosas) atrelada aos achados encontrados na avaliação histológica do presente estudo, foi vista em estudos anteriores e pode estar associada à redução, provocada pela oxaliplatina, do neurofilamento 200 (NF200) em nervos ciáticos, que leva a uma alteração na manutenção da morfologia das células neuronais causando fibras nervosas irregulares e degeneração da mielina (MEYER, 2011; TALEB, 2017). Nesse contexto, os desarranjos na morfologia ou danos gerados nos nervos ciáticos podem ser também explicados em parte pelo aumento da apoptose nesses tecidos, através da suprarregulação de caspase-3 e do seu ativador MAPK14 mediado pela OXL (CELIK, 2020).

Os resultados do presente estudo, assim como de outros (AZEVEDO et al., 2013; KIM et al., 2015; TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020), mostraram que a oxaliplatina reduziu os níveis de GSH e elevou os níveis de MDA tanto na medula como no nervo ciático (AZEVEDO et al., 2013; KIM et al., 2015). Em decorrência disso, apresentaram as mesmas alterações histológicas e morfológicas supracitadas, isso explica a forte correlação entre o desbalanço redox e as alterações teciduais e morfológicas causadas nesses tecidos.

A McLTP1 preveniu essas mudanças parcialmente, mantendo o tecido analisado com um aspecto similar aos animais que não receberam oxaliplatina. Foi observado, secções histológicas constituídas por fibras nervosas em sua maioria íntegras e organizadas, em áreas focais, observou-se presença de células inflamatórias reduzidas e dispersas, em sua maioria, mononucleares, e secções com poucas porções com características de atrofia e edema de tecido conjuntivo.

Esses resultados, demonstram a ação neuroprotetora da McLTP1, podendo ter envolvimento principalmente da ação antioxidante. Sabe-se que compostos com ação antioxidante ao intervirem sobre a redução do MDA e atuarem aumentando os níveis de GSH, (atenuam o estresse oxidativo aumentando os níveis de antioxidantes) mostram respostas positivas na avaliação histológica com melhora em nervos ciáticos (KIM et al., 2015) e em medula espinhal (AZEVEDO et al., 2013) mantendo a aparência morfológica normal dos nervos, semelhante aos grupos controles (AZEVEDO et al., 2013; KIM et al., 2015). Essa ação neuroprotetora pela ação antioxidante, pôde também ser confirmada pela redução da marcação de nitrotirosina (um marcador de estresse oxidativo) reduzido pela McLTP1.

O estresse oxidativo gerado pela oxaliplatina nesses tecidos orchestra e confirma mais uma vez, um dos principais mecanismos envolvidos na neurotoxicidade da oxaliplatina, já bem estabelecido na literatura, que é o desequilíbrio redox e o estresse oxidativo. Dentre os mecanismos envolvidos que ocasionam isso, é o próprio efeito alquilante do quimioterápico,

com consequente ação de vias indiretas (inflamatórias, apoptóticas, mitocondriais, retículo plasmático, entre outras) nos tecidos (DI CESARE et al., 2012; AZEVEDO, 2013; WASEEM; PARVEZ, 2015; CELIK, 2020)

A imunexpressão de ATF-3 nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRD) mostrou também está superexpresso no modelo experimental proposto. Esse marcador é ativado na maioria dos estímulos nocivos leva a lesão tecidual e/ou nervosa, sendo muito confiável para marcação de lesão nervosa em neurônios de fibras aferentes primárias que são ativadas após a administração de substâncias químicas nocivas (BRÁZ; BASBAUM, 2010). Diante disso, o aumento de ATF-3, no modelo em estudo, mostra o quanto este marcador está envolvido e modulando a ativação da via nociceptiva provocado pela neuropatia da oxaliplatina, e o quanto aumenta sua expressão (PEREIRA et al., 2018; PONTES; LINO; VALE, 2018; PEREIRA, 2015).

A McLTP1, por sua vez, diminuiu a expressão também de ATF-3, corroborando com o efeito antinociceptivo, visto nos testes comportamentais. A ação sobre esse marcador, pode ter envolvimento da possível ação moduladora da McLTP1 sobre os receptores de TRPM8, pois foi visto que a administração de mentol (agonista do receptor TRPM8) nas patas traseiras de camundongos induziu a expressão de ATF3 em uma ampla variedade e em subpopulações distintas de neurônios sensoriais das vias aferentes (BRÁZ; BASBAUM, 2010).

Esse estudo traz a perspectiva de que se associada a quimioterapia com oxaliplatina pode trazer respostas positivas. O estudo de compostos ou moléculas naturais pode auxiliar e ser uma medida propedêutica na identificação de produtos capazes de reduzir os efeitos colaterais neurotóxicos provocados pela quimioterapia. Além disso, pode oferecer uma abordagem terapêutica associada a outros compostos à natureza multifatorial da patogênese da neuropatia. Pois muitos mecanismos subjacentes a neuropatia induzida por oxaliplatina se sobrepõem e podem se reforçar mutuamente (DI CESARE et al., 2017)

Assim, uma terapia de combinação de drogas também pode ser uma abordagem interessante e mais eficaz (em comparação com a monoterapia) para a prevenção da neuropatia induzida por oxaliplatina. Embora não existam algoritmos claros para o uso clínico de drogas combinadas em pacientes com essa condição clínica, dados de pesquisas pré-clínicas indicam que certas combinações de drogas podem atenuar efetivamente o processo lesivo nervoso e os sintomas da neuropatia induzida por oxaliplatina, bem como auxiliar na ação antitumoral, já que o tumor também possui natureza multifatorial da patogênese (DI CESARE et al., 2017).

Esse estudo também traz uma contribuição propedêutica para outras pesquisas nessa mesma linha, na busca para tentar compreender tanto o mecanismo de ação da McLTP1 na neuropatia, como sua ação coadjuvante na terapêutica antitumoral associada a oxaliplatina.

Portanto, faz-se necessário avaliar a ação da McLTP1 baseada em mecanismos de iniciação, como uma possível ação farmacocinética, na perspectiva de observar se sua ação já ocorre inicialmente a nível vascular, podendo ligar-se a oxaliplatina, tornando-se uma macromolécula no qual possa estar impedindo parcialmente a oxaliplatina de se distribuir ou ultrapassar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso. Ou seja, avaliar se sua ação neuroprotetora ou preventiva já acontece antes mesmo da oxaliplatina passar e atingir as células nervosas. Pois nos testes supracitados, a McLTP1 é administrada por gavagem 60 minutos antes da administração da oxaliplatina intravenosa. Ou seja, a oxaliplatina é administrada no início do pico plasmático da McLTP1 e no início do pico máximo de sua resposta antinociceptiva (COSTA, 2016). Pesquisar essa ação tem grande relevância, tendo em vista que pode trazer um melhor entendimento da etiologia da neuropatia após a administração da oxaliplatina no sangue; entender melhor como a oxaliplatina passa do sistema vascular para o tecido nervoso; e determinar o papel do sistema vascular intra-nervoso no aparecimento da neuropatia, no qual poderia permitir o desenvolvimento de novos caminhos terapêuticos e terapias baseadas em mecanismos de iniciação (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020)

É válido também avaliar a ação da McLTP1 na possível ação antitumoral a partir de culturas de células (MC38 - câncer de colorretal metastático), com a mesma dose/concentração proporcional desse estudo ou com doses menores de oxaliplatina, para verificar se na dose em estudo ela potencializa a ação antitumoral da oxaliplatina e com doses fracionadas, se ela apresenta o mesmo potencial, na perspectiva de redução da dose clínica da oxaliplatina, na tentativa de prevenir a neuropatia. Tendo em vista que na clínica, já realizam essa redução quando os sintomas da neuropatia estão severos ou quando a neuropatia se classifica em grau 3 ou 4 (BHATNAGAR et al., 2014; SALAT, 2020). Além disso, investigar também o possível envolvimento da McLTP1 a partir da possível modulação sobre o fator NFAT, sobre a ação antitumoral (KAUNISTO et al., 2015; LIU et al., 2013; SHOU et al., 2015; GIESE; HIND; HUTTENLOCHER, 2019; GAO et al., 2022).

É importante também avaliar e confirmar a possível ação da McLTP1 sobre os receptores TRPM8 e investigar sua influência como mecanismo antinociceptivo ou neuroprotetor na neuropatia induzida por oxaliplatina, seja por inibição, antagonismo, noucaute desse transportador, bem como sua influência sobre o RNAm do TRPM8

(DESCOEUR et al., 2011; KAWASHIRI et al., 2012; KATO et al., 2014; MIZUNO et al., 2014). Além disso, torna-se importante investigar também, se de fato a modulação do TRPM8 a partir do NFAT (KAWASHIRI et al., 2012) está ocorrendo pela McLTP1 e se esta possível modulação está sendo um fator importante na diminuição da hipernocicepção da neuropatia provocada pela oxaliplatina.

Faz-se também necessário avaliar ou investigar a possível ação da McLTP1 sobre processos ou vias imunológicas pró-inflamatórias sistêmica, como sua ação sobre citocinas, tendo em vista que a McLTP1 elevou significativamente o número de linfócitos e neutrófilos, onde várias citocinas participam no processo de ativação, proliferação e migração desses componentes celulares. Avaliar essa ação sobre as citocinas, permite também investigar se há influência na ação antitumoral e na morte imunogênica (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020) pela McLTP1, talvez por ação direta sobre as citocinas ou indireta através do aumento dos linfócitos e neutrófilos no ambiente tumoral. Além disso, a modulação da McLTP1 sobre as citocinas pode ter grande influência nos mecanismos de diminuição do processo inflamatório e lesivo nas células nervosas presente neuropatia induzida por oxaliplatina. Pois sabe-se que a oxaliplatina pode desencadear eventos neuroinflamatórios provocando alterações consistente de citocinas pró-inflamatórias como antiinflamatórias em GRDs (BURAKGAZI et al., 2011; WANG et al., 2017; XU et al., 2018; BRANDOLINI et al., 2019) causando sensibilização periférica e central de neurônios nociceptivos (JAGGI; SINGH, 2012; LEES et al., 2017) bem como ativação de células imunes para o local (MAKKER et al., 2017).

E por último, faz-se imperativo também avaliar ação da McLTP1 sobre a proliferação celular de linfócitos e neutrófilos, no possível benefício sobre a neuropatia e no possível efeito sinérgico antitumoral da oxaliplatina.

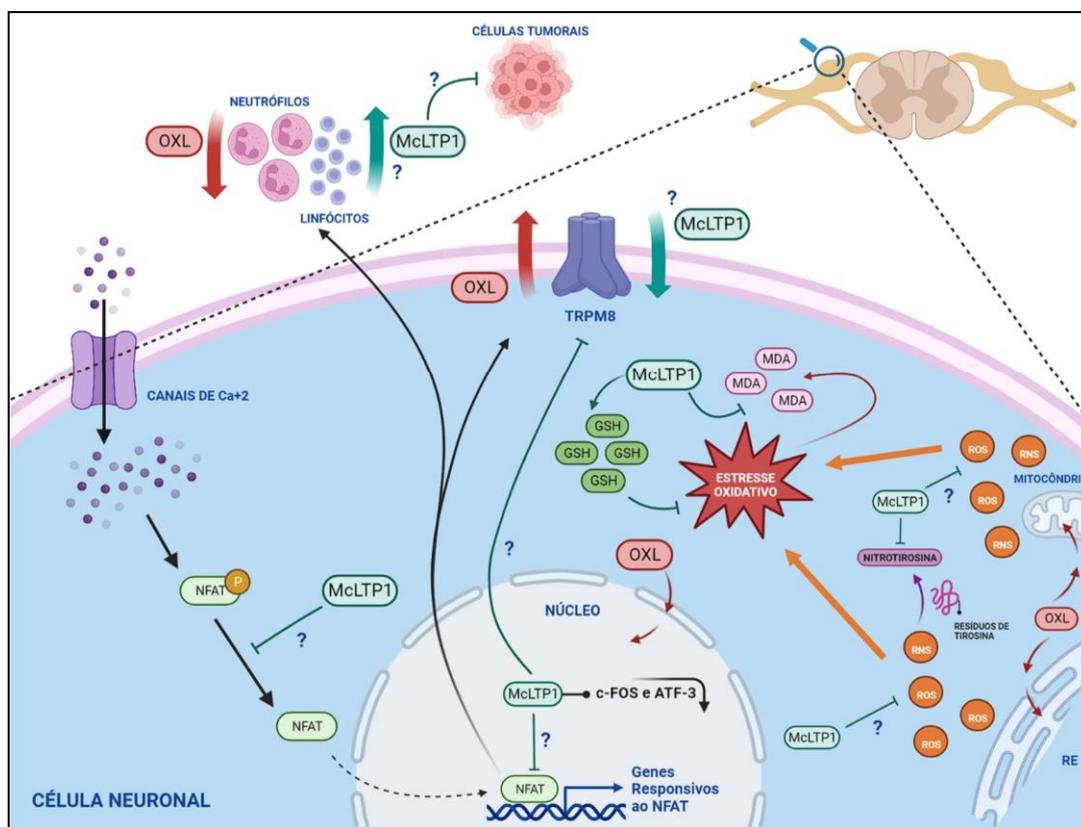
Esse estudo traz como contribuição, a partir de um composto natural, uma perspectiva de que se associada com oxaliplatina, pode trazer respostas no sentido de melhorar os processos nociceptivos presente na neuropatia induzida por esse quimioterápico, seja por ação sobre os receptores TRPM8 ou pela atividade antioxidante; ou atuar como neuroprotetor, também através de sua ação antioxidante; e ao mesmo tempo possivelmente contribuir de forma sinérgica no efeito antitumoral da oxaliplatina.

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que a administração diária na dose de 4mg/kg da proteína isolada de sementes de *Morinda citrifolia* (McLTP1) em camundongos submetidos a neuropatia periférica por oxaliplatina:

- Tem efeito antinociceptivo;
- Não altera e nem modula o comprometimento comportamental e motor;
- Mostra possível participação dos receptores TRPM8, mas não TRPA1, no seu efeito antinociceptivo;
- Apresenta efeito neuroprotetor em GRD e nervo ciático
- Apresenta ação moduladora sobre o estresse oxidativo em medula espinal e nervo ciático;
- Previne a linfopenia e neutropenia provocada pela oxaliplatina.

Figura 14: Possíveis mecanismos de ação da McLTP1



Fonte: dados do estudo e autoria própria. A figura representa os possíveis mecanismos de ação da McLTP1 na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina. GSH: Glutaciona reduzida; McLTP1: Proteína Transferidora de Lipídeos Isolada de sementes de *Morinda citrifolia*; MDA: malondialdeído; NFAT: Fator Nuclear de Células T Ativadas; OXL: Oxaliplatina; ROS: Espécies reativas de oxigênio; ROS: Espécies reativas do Nitrogênio; TRPM8: Receptores de Potencial Transiente Melastatina 8.

9 REFERÊNCIAS

- ALBERTI, P. et al. Physician-assessed and patient-reported outcome measures in chemotherapy-induced sensory peripheral neurotoxicity: two sides of the same coin. **Ann Oncol**, v. 25, n. 1, p. 257-64, 2014.
- ALBERTI, P. et al. Topiramate prevents oxaliplatin-related axonal hyperexcitability and oxaliplatin induced peripheral neurotoxicity. **Neuropharmacology**, v.164, 2020.
- ALCINDOR, T.; BEAUGER, N. Oxaliplatin: A review in the era of molecularly targeted therapy. **Current Oncology**, v. 18, n. 1, p. 18–25, 2011.
- ALEJANDRO, L. M. et al. Predicting acute and persistent neuropathy associated with oxaliplatin. **Am. J. Clin. Oncol**, v. 36, p. 331–337, 2013.
- AL-MASSRI, K. F.; AHMED, L. A.; EL-ABHAR, H. S. Mesenchymal stem cells in chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a new challenging approach that requires further investigations. **J Tissue Eng Regen Med**, 2019.
- ALQUDAH, M. et al. Vitamin E protects human lymphocytes from genotoxicity induced by oxaliplatin. **Drug Chem Toxicol.**, v. 41, n. 3, p. 281-286, 2018.
- ANAND, U.; OTTO, W. R.; ANAND, P.. Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. **Mol. Pain**, v. 6, n. 82, 2010.
- ANDRADE, D. C. et al. Pregabalin for the Prevention of Oxaliplatin-Induced Painful Neuropathy: A Randomized, Double-Blind Trial. **Oncologist**, v. 22, n. 10, p. 1154, 2017.
- ANDRÉ, T. et al. The IDEA (International Duration Evaluation of Adjuvant Chemotherapy) Collaboration: Prospective Combined Analysis of Phase III Trials Investigating Duration of Adjuvant Therapy with the FOLFOX (FOLFOX4 or Modified FOLFOX6) or XELOX (3 versus 6 months) Regimen for Patients with Stage III Colon Cancer: Trial Design and Current Status. **Curr Colorectal Cancer Rep**, v. 9, n. 3, p. 261-269, 2013.
- APOSTOLIDIS, L. Dorsal root ganglia hypertrophy as in vivo correlate of oxaliplatin-induced polyneuropathy. **PLoS One**, v, 12, n. 8, 2017.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- ARETI, A. et al. Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. **Redox Biol**, v. 18, n. 2, p. 289-295, 2014.
- ARETI, A.; KOMIRISHETTY, P.; KUMAR, A. Carvedilol prevents functional deficits in peripheral nerve mitochondria of rats with oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 322, p. 97-103, 2017.
- ARGYRIOU, A. A. et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): An update. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 82, n. 1, p. 51–77, 2012.

ARGYRIOU, A. A. et al. Neurophysiological, nerve imaging and other techniques to assess chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in the clinical and research settings. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, 2019.

ARGYRIOU, A. A. et al. Voltage-gated sodium channel polymorphisms play a pivotal role in the development of oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: results from a prospective multicenter study. **Cancer**, v. 119, p. 3570-3577, 2013.

ARGYRIOU, A. A. Updates on Oxaliplatin-Induced Peripheral Neurotoxicity (OXAIPN). **Toxics**, v. 3, n. 2, p. 187–197, 2015.

ARKENAU, H. K. Capecitabine combined with oxaliplatin (CAPOX) in clinical practice: how significant is peripheral neuropathy? **Ann Oncol**, v. 22, n. 1, p. 239-240, 2011.

AZEVEDO, M. I. et al. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Mol Pain**, v. 9, p. 53, 2013.

BAO, T. et al. Long-term chemotherapy-induced peripheral neuropathy among breast cancer survivors: prevalence, risk factors, and fall risk. **Breast Cancer Res Treat**, v. 159, n. 2, p. 327-333, 2016.

BEIJERS, A. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and impact on quality of life 6 months after treatment with chemotherapy. **J Community Support Oncol**, v. 12, n. 11, p. 401-406, 2014.

BEIJERS, A. J. M. et al. Multicenter randomized controlled trial to evaluate the efficacy and tolerability of frozen gloves for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Ann Oncol**, v. 31, p. 131–136, 2020.

BEIJERS, A. J.; MOLS, F.; VREUGDENHIL, G. A systematic review on chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the relation with oxaliplatin administration. **Support Care Cancer**, v. 22, n. 7, p. 1999-2007, 2014.

BEUKEMA, P. et al. TrpM8-mediated somatosensation in mouse neocortex. **J Comp Neurol.**, v. 526, n. 9, p. 1444-1456, 2018.

BHATNAGAR, B. et al. Chemotherapy dose reduction due to chemotherapy induced peripheral neuropathy in breast cancer patients receiving chemotherapy in the neoadjuvant or adjuvant settings: a single-center experience. **Springer plus**, v. 3, p. 366, 2014.

BOYETTE-DAVIS, J. A. et al. An updated understanding of the mechanisms involved in chemotherapy-induced neuropathy. **Pain Manag**, v. 8, n. 5, p. 363-375, 2018.

BOYETTE-DAVIS, J., DOUGHERTY, P. M. Protection against oxaliplatin induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline. **Exp. Neurol**, v. 229, 353–357, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.722, p. 248-254, 1976.

BRANCA, J. J. V. et al. Oxaliplatin-induced blood brain barrier loosening: A new point of view on chemotherapy-induced neurotoxicity. **Oncotarget**, v. 9, n. 34, p. 23426–23438, 2018.

BRANDOLINI, L. et al. DF2726A, a new IL-8 signalling inhibitor, is able to counteract chemotherapy-induced neuropathic pain. **Sci Rep**, v. 9, 2019.

BRÁZ, J. M.; BASBAUM, A. I. Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli. **Pain**, v. 150, n. 2, p. 290-301, 2010.

BREWER, J.R. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: current status and progress. **Gynecol. Oncol**, v. 140, p. 176–183, 2016.

BRIANI, C. et al. Long-term course of oxaliplatin-induced polyneuropathy: a prospective 2-year follow-up study. **J Peripher Nerv Syst**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2014.

BRIANI, C. et al. Ultrasound assessment of oxaliplatin-induced neuropathy and correlations with neurophysiologic findings. **Eur J Neurol**, v. 20, n. 1, p. 188-92, 2013.

BULUA, A. C. et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). **J Exp Med**, v. 208, n. 3, p. 519-533, 2011.

BURAKGAZI, A. Z. et al. Longitudinal assessment of oxaliplatin-induced neuropathy. **Neurology**, v. 77, n. 10, p. 980-6, 2011.

CAETANO, M. S. et al. NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. **FASEB J.**, vol. 16, n. 14, p. 1940-1942, 2002.

CALLS, A. et al. Pathogenesis of platinum-induced peripheral neurotoxicity: Insights from preclinical studies. **Exp Neurol**, v. 325, n. 113141, 2020.

CAMPOS, D. C. O. et al. First isolation and antinociceptive activity of a lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia*) seeds. **Internat. J. Biolog. Macromol.** v. 86, p. 71–79, 2016.

CAMPOS, D. C. O. et al. *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. **Int J Biol Macromol**, v. 103, p. 1121-1129, 2017.

CAMPOS, D. C. O. **Isolamento de um princípio ativo de natureza proteica de sementes de *Morinda citrifolia* L. com potencial para alívio da inflamação e da dor.** Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. 2013

CANTA, A. et al. Calmangafodipir Reduces Sensory Alterations and Prevents Intraepidermal Nerve Fibers Loss in a Mouse Model of Oxaliplatin Induced Peripheral Neurotoxicity. **Antioxidants** (Basel), v. 9, n. 7, p. 594, 2020.

CANTA, A.; POZZI, E.; CAROZZI, V. A. Mitochondrial Dysfunction in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). **Toxics**, n. 3, p. 198-223, 2015.

CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: what do we know about mechanisms? **Neurosci. Lett**, v. 596, p. 90–107, 2015.

CASPANI, O. et al. The Contribution of TRPM8 and TRPA1 Channels to Cold Allodynia and Neuropathic Pain. **PLoS One**, n. 10, v. 4, out. 2009.

CASTELLI, V. et al. Probiotic DSF counteracts chemotherapy induced neuropathic pain. **Oncotarget**, 2018.

CAVALETTI, G. et al. The chemotherapy-induced peripheral neuropathy outcome measures standardization study: from consensus to the first validity and reliability findings. *Ann Oncol.* v. 24, n. 2, p. 454-462, 2013.

CAVALETTI, G., MARMIROLI, P. Management of Oxaliplatin-Induced Peripheral Sensory Neuropathy. **Cancers** (Basel), v. 12, n. 6, p. 1370, 2020.

CECCHIN, E. et al. Host genetic profiling to increase drug safety in colorectal cancer from discovery to implementation. **Drug Resist Updat**, v. 39, p.18-40, 2018.

CELIK, H. et al. Lycopene protects against central and peripheral neuropathy by inhibiting oxaliplatin-induced ATF-6 pathway, apoptosis, inflammation and oxidative stress in brains and sciatic tissues of rats. **Neurotoxicology**, v. 80, p. 29-40, 2020.

CERESA, C.; CAVALETTI, G. Drug transporters in chemotherapy induced peripheral neurotoxicity: current knowledge and clinical implications. **Curr. Med. Chem**, v. 18, p. 329-341, 2011.

CHEN, K. et al. O bloqueio de PAR2 atenua a dor neuropática induzida por oxaliplatina via TRPV1 e libera a substância P e CGRP no corno dorsal superficial da medula espinhal. **J. Neurol. Sci.** ; v. 352, n. 1-2, p. 62–67, 2015.

CHIORAZZI, A.; SEMPERBONI, S.; MARMIROLI, P.. Current view in platinum drug mechanisms of peripheral neurotoxicity. **Toxics**, v. 3, p. 304–321, 2015.

CHOI, Y. et al. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 59, p. 369-376, 1994.

CHUKYO, A. et al. Oxaliplatin-induced changes in expression of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a neuropathic mechanism for cold hypersensitivity. **Neuropeptides**, v. 67, p. 95–101, 2018.

CLIF, J. et al. The molecular genetics of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 120, p. 127–40, 2017.

COLVIN, L. A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: where are we now?. **Pain**; v. 160, p. 1–10, 2019.

CORIAT, R. et al. Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir. **J Clin Invest**, v. 124, n. 1, p. 262-72, 2014.

COSTA, A. S. **Avaliação da estabilidade e da toxicidade pré-clínica de uma proteína isolada de sementes de Noni (*Morinda citrifolia* L.), como etapas preliminares para seu uso terapêutico em humanos.** Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica. 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V.; et al. Analgesic, antiinflammatory and central depressor effects of the hydroalcoholic extract and fractions from *Aeolanthus suaveolens*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 821-824, 2004.

CRUCCU, G. et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol.*, v. 17, n. 8, p. 1010-1018, 2010.

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

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

DEUIS, J. R. et al. An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. **Pain**, v. 154, n. 9, p. 1749-1757, 2013.

DEUIS, J. R. et al. Analgesic effects of clinically used compounds in novel mouse models of polyneuropathy induced by oxaliplatin and cisplatin. **Neuro Oncol**, v. 16, n. 10, p.1324-1332, 2014.

DI CESARE M. et al. Oxaliplatin-induced neuropathy: Oxidative Stress as Pathological Mechanism. Protective Effect of Silibinin. **Journal of Pain**, v. 13, n. 3, p. 276-284, 2012.

DI CESARE M. L. et al. In Vitro Evidence for the Use of Astragali Radix Extracts as Adjuvant against Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity. **Planta Med**, v. 81, p. 12-13, p. 1045-1055, 2015.

DI CESARE, M. L. et al. Morphologic features and glial activation in rat oxaliplatin-dependent neuropathic pain. **J Pain**, v. 14, n. 12, p. 1585-600, 2013a.

DI CESARE, M. L. et al. Oxaliplatin-induced oxidative stress in nervous system-derived cellular models: could it correlate with in vivo neuropathy? **Free Radic Biol Med**, v. 61, p. 143-50, 2013b.

DI CESARE, M. L. et al. Astragali radix: could it be an adjuvant for oxaliplatin-induced neuropathy? **Sci Rep**, v. 7, n. 4, p. 2021, 2017.

DI CESARE, M. L. et al. Effects of natural and synthetic isothiocyanate-based H₂S-releasers against chemotherapy-induced neuropathic pain: Role of Kv7 potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 15, n. 121, p. 49-59, 2017.

DILRUBA, S.; KALAYDA, G. V. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 1103–24, 2016.

DIZ, M. S. et al. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. **Physiol Plant**, v. 142, n. 3, p. 233-246, 2011.

DO CARMO, L. D. et al. Therapeutic effects of a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* L. (noni) seeds on irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, v. 395, n. 9, p. 1097-1107, 2022.

DORSEY, S. G. et al. The national cancer institute clinical trials planning meeting for prevention and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **J Natl Cancer Inst**, v. 111, n. 6, p. 531-537, 2019.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-31, 1990.

DROTT, J. et al. Oxaliplatin-induced neurotoxic side effects and their impact on daily activities: A longitudinal study among patients with colorectal cancer. **Cancer nursing**, v. 42, n. 6, p. 40-48, 2019.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc**, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

EWERTZ, M.; QVORTRUP, C.; ECKHOFF, L. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients treated with taxanes and platinum derivatives. **Acta Oncol (Madr)**, v. 54, p. 587–91, 2015.

FARGUHAR-SMITH, P.; BROWN, M. R. D. Persistent pain in cancer survivors: Pathogenesis and treatment options. **Pain Clinical Updates XXIV** (London, UK), p. 1–8, 2016.

FINNERUP, N. B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 2, p. 162-73, 2015.

FLATTERS, S. J. L.; DOUGHERTY, P. M.; COLVIN, L. A. Clinical and preclinical perspectives on chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): a narrative review. **Br J Anaesth**, v. 119, p. 737-749, 2017.

FUJITA, S. et al. Identification of drug transporters contributing to oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. **J Neurochem**, v. 148, n. 3, p. 373-385, 2019.

GADGIL, S. et al. A systematic summary and comparison of animal models for chemotherapy induced (peripheral) neuropathy (CIPN). **PLoS One**, v. 14, n. 8, 2019.

GAUCHAN, P. et al. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. **Neuroscience Letters**, v. 458, n. 2, p. 93–95, jul. 2009.

GEBREMEDHN, E. G.; SHORTLAND, P. J.; MAHNS, D. A. The incidence of acute oxaliplatin-induced neuropathy and its impact on treatment in the first cycle: a systematic review. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 410, 2018.

GIESE, M. A.; HIND, L. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2159-2167, 2019.

GLIMELIUS, B. et al. Persistent prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy using calmagufodipir (PledOx®): a placebo-controlled randomised phase II study (PLIANT). **Acta Oncol (Madr)**, v. 57, p. 393–402, 2018.

GODINHO, P. A. R. et al. Electronic von Frey as an objective assessment tool for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: A prospective longitudinal study. **Eur J Cancer Care (Engl)**, v. 30, n. 1, 2021.

GODINHO, P. A. R. et al. FLOX (5-fluorouracil + leucovorin + oxaliplatin) chemotherapy for colorectal cancer leads to long-term orofacial neurotoxicity: a STROBE-guided longitudinal prospective study. **Int J Clin Oncol**, v. 25, n. 12, p. 2066-2074, 2020.

GORJANOVIC, S. et al. Malting Barley Grain Non-specific Lipid-Transfer Protein (ns-LTP): Importance for Grain Protection. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, p. 99-104, 2005.

GRISOLD, W.; GRISOLD, A., LÖSCHER, W. N. Neuromuscular complications in cancer. **J Neurol Sci**, v. 367, p. 184-202, 2016.

GROTHEY, A. et al. Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 4, p. 421-427, 2011.

HAANPÄÄ, M. et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. **Pain**, v. 152, n. 1, p. 14-27, 2011.

HAMITY, M. V.; WHITE, S. R.; HAMMOND, D. L. Effects of neurokinin-1 receptor agonism and antagonism in the rostral ventromedial medulla of rats with acute or persistent inflammatory nociception. **Neuroscience**, v. 162, p. 902, 2010.

HAN, C. H. et al. Phase I drug-interaction study of effects of calcium and magnesium infusions on oxaliplatin pharmacokinetics and acute neurotoxicity in colorectal cancer patients. **BMC Cancer**, v. 13, p. 495, 2013.

HARRACH S, CIARIMBOLI G. Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs. **Front Pharmacol**, v. 6, n. 85, 2015.

HERSHMAN, D. L. et al. Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, p. 1941-1967, 2014.

HATO, S. V. et al. Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 11, p. 2831-2837, 2014.

HODGE, M. R. et al. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp deficient mice. **Immunity**, v. 4, n. 4, p. 397-405, 1996.

HOHMANN, S. W. et al. The G2A receptor (GPR132) contributes to oxaliplatin-induced mechanical pain hypersensitivity. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 446, 2017.

HU, S. et al. Recent developments of novel pharmacologic therapeutics for prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Clin Cancer Res**, v. 25, p. 6295-301, 2019.

HU, Y. et al. IL-15-induced lymphocytes as adjuvant cellular immunotherapy for gastric cancer. **Invest New Drugs**, v. 39, n. 6, p. 1538-1548, 2021.

IBRAHIM, E. Y.; EHRLICH, B. E. Prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A review of recent findings. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 145, p. 102831, 2020.

IMAI, S. et al. Taxanes and Platinum Derivatives Impair Schwann Cells via Distinct Mechanisms. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

INADA, M. et al. Associations between oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and polymorphisms of the ERCC1 and GSTP1 genes. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther**, v. 48, p. 729-734.

JAGGI, A. S.; SINGH, N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. **Toxicology**, v. 291, n. 1-3, p. 1-9, 2012.

JANES, K. et al. Bioenergetic deficits in peripheral nerve sensory axons during chemotherapy-induced neuropathic pain resulting from peroxynitrite-mediated post-translational nitration of mitochondrial superoxide dismutase. **Pain**, v. 154, n. 11, p. 2432-2440, 2013.

JONG, N. N. et al. Oxaliplatin transport mediated by organic cation/carnitine transporters OCTN1 and OCTN2 in overexpressing human embryonic kidney 293 cells and rat dorsal root ganglion neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 338, n. 2, p. 537-547, 2011.

JORDAN, B. et al. Calcium and Magnesium Infusions for the Prevention of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neurotoxicity: A Systematic Review. **Oncology**, v. 90, n. 6, p. 299-306, 2016.

KADER, J. C. Lipid-transfer proteins in plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 47, p. 627-654, 1996.

KAGIAVA, A. et al. Oxaliplatin-induced neurotoxicity is mediated through gap junction channels and hemichannels and can be prevented by octanol. **Neuropharmacology**, v. 97, p. 289-305, 2015.

KANAT, O.; ERTAS, H.; CANER, B. Platinum-induced neurotoxicity: a review of possible mechanisms. **World J Clin Oncol**, v. 8, n. 329, 2017.

KANG, L. et al. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical features, mechanisms, prevention and treatment. **J Neurol**, 2020.

KARLSSON, J. O. G.; ANDERSSON, R. G.; JYNGE, P. Mangafodipir a Selective Cytoprotectant - with Special Reference to Oxaliplatin and Its Association to Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). **Transl Oncol**, v. 10, n. 4, p. 641-649, 2017.

KATO, Y. et al. Gosha-jinki-Gan reduced oxaliplatin-induced hypersensitivity to cold sensation and its effect would be related to suppression of the expression of TRPM8 and TRPA1 in rats. **Anti-Cancer Drugs**, v. 25, p. 39-43, 2014.

KAUNISTO, A. et al. NFAT1 promotes intratumoral neutrophil infiltration by regulating IL8 expression in breast cancer. **Mol Oncol.**, v. 9, n. 6, p. 1140-1154, 2015.

KAWASHIRI, T. et al. L type Ca²⁺ channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. **Mol Pain**, v. 8, p. 7, 2012.

KAWASHIRI, T. et al. Dimethyl fumarate ameliorates chemotherapy agent-induced neurotoxicity in vitro. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 137, p. 202-211, 2018.

KAWASHIRI, T. et al. Donepezil ameliorates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via a neuroprotective effect. **J Pharmacol Sci**, v.140, n. 3, p. 291-294, 2019.

KAWASHIRI, T. et al. Therapeutic Agents for Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy; Experimental and Clinical Evidence. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 3, p. 1393, 2021.

KELLEY, M. R. et al. Role of the DNA base excision repair protein, APE1 in cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin induced sensory neuropathy. **PLoS One**, v. 9, n. 9, 2014.

KELLEY, M. R. et al. Identification and characterization of new chemical entities targeting apurinic/aprimidinic endonuclease 1 for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 359, p. 300-9, 2016.

KIM, H. J.; LEE, S. Y.; OH, S. C. The Inositide Signaling Pathway As a Target for Treating Gastric Cancer and Colorectal Cancer. **Front Physiol**, v. 9, n. 7, p. 168, 2016.

KIM, S. T. et al. Protective effects of phosphatidylcholine on oxaliplatin-induced neuropathy in rats. **Life Sci.**, v. 130, p. 81-87, 2015.

KING, K. M. et al. Single and combined effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. **Br J Pharmacol**, v. 174, n. 17, p. 2832-2841, 2017.

KINTZING, R.; FILSINGER INTERRANTE, M.V.; COCHRAN, J. R. Emerging strategies for developing next-generation protein therapeutics for cancer treatment. **Trends Pharmacol. Sci.**, p. 993-1008, 2016.

- KLECKNER, I. R. et al. Effects of exercise during chemotherapy on chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a multicenter, randomized controlled trial. **Support Care Cancer**, v. 26, n. 4, p. 1019-1028, 2018.
- KOKOTIS, P. et al. Oxaliplatin-induced neuropathy: a long-term clinical and neurophysiologic follow-up study. **Clin Colorectal Cancer**, v.15, n. 133, 2016.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.
- LANGFORD, D. C; et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature methods**, v. 7, n. 6, p. 447-449, 2010.
- LE, T.; PA, L.; WINDEBANK, A. J. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. **Mol Pain**, v. 5, n. 9, 2009.
- LEADER, B.; BACA, Q.J.; GOLAN, D.E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification, **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 7, n. 1, p. 21-39, 2008.
- LEE, C.; GIANOS, M.; KLAUSTERMEYER, W. B. Diagnosis and management of hypersensitivity reactions related to common cancer chemotherapy agents. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 119, n. 5, p. 422–428, 2017.
- LEE, J. Y. et al. Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. **J Mol Biol**, v. 276, n. 2, p. 437-448, 1998.
- LEE, P. R. et al. TRPM8 Mediates Hyperosmotic Stimuli-Induced Nociception in Dental Afferents. **J Dent Res.**, v. 99, n. 1, p. 107-114, 2020.
- LEE, Y. R.; JOO, H. K.; JEON, B. H. The Biological Role of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease1/Redox Factor-1 as a Therapeutic Target for Vascular Inflammation and as a Serologic Biomarker. **Biomedicines**, v. 8, n. 3, p. 57.
- LEES, J. G. et al. Immune-mediated processes implicated in chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Eur J Cancer**, v. 73, p. 22-29, 2017.
- LESTERHUIS, W. J. et al. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. **J Clin Invest**, 2011.
- LI, C. et al. Calmodulin binds to maize lipid transfer protein and modulates its lipids binding ability. **FEBS J**, v. 275, n. 21, p. 5298-5308, 2008.
- LI, J. et al. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. **Bot Stud**, v. 62, n. 1, p. 5, 2021.
- LI, J. et al. Genome-wide survey and expression analysis of the putative non-specific lipid transfer proteins in *Brassica rapa* L. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.

LIMA, A. M. et al. Efeito antimicrobiano de uma proteína transferidora de lipídeos (McLTP1) isolada de sementes de noni. XXXVI Encontro de Iniciação Científica. **Revista de Encontros Universitários da UFC**, v. 2, n. 1, 2017.

LINDORFF-LARSEN, K.; WINTHER, J. R. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. **FEBS Lett**, v. 488, n. 3, p. 145-148, 2001.

LIU, J. F. et al. Depleting NFAT1 expression inhibits the ability of invasion and migration of human lung cancer cells. **Cancer Cell Int**, 2013.

LIU, J. J. et al. Contributions of rat Ctr1 to the uptake and toxicity of copper and platinum anticancer drugs in dorsal root ganglion neurons. **Biochem. Pharmacol**, v. 85, p. 207–215, 2013.

LIU, Y. J. et al. Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 294, p. 535-540, 2002.

LIU, M. et al. NFATc2-dependent Epigenetic Downregulation of the TSC2/Beclin-1 Pathway is Involved in Neuropathic Pain Induced by Oxaliplatin. **Mol Pain**, 2023.

LOPRINZI, C. L. et al. Phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of intravenous calcium and magnesium to prevent oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity (N08CB/Alliance). **J Clin Oncol**, v. 32, n. 10, p. 997-1005, 2014.

LOPRINZI, C. L. et al. Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. **J Clin Oncol**, v. 38, n. 28, p. 3325-3348, 2020.

LUTIF, C. C. **Caracterização bioquímica e avaliação das atividades citotóxicas e alergênicas de uma proteína transferidora de lipídeos isolada de sementes de *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae)**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em bioquímica. Departamento de bioquímica e biologia molecular. Universidade Federal do Ceará, 2015.

MAHMOUDPOUR, S. H. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: evidence from genome-wide association studies and replication within multiple myeloma patients. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 820, 2018.

MAKKER, P. G. et al. Characterisation of immune and neuroinflammatory changes associated with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **PLoS ONE**, v. 12, 2017.

MARMIROLI, P. et al. Calcium related neurotoxicity of oxaliplatin: understanding the mechanisms to drive therapy. **Curr. Med. Chem**, v. 22, p. 3682–3694, 2015.

MARMIROLI, P. et al. Susceptibility of different mouse strains to oxaliplatin peripheral neurotoxicity: Phenotypic and genotypic insights. **PLoS One**, v. 12, n. 10, 2017.

MARTIN, J. R.; BAETTIG, K.; BIRCHER, J. Maze patrolling: open-field behavior and runway activity following experimental portacaval anastomosis in rats. **Physiol. Behav**, v. 25, p. 713–719, 1980.

MARTINOV, T. et al. Measuring Changes in Tactile Sensitivity in the Hind Paw of Mice Using an Electronic Von Frey Apparatus. **J. Vis. Exp**, v. 82, 2013.

MASSICOT, F. et al. P2X7 cell death receptor activation and mitochondrial impairment in oxaliplatin-induced apoptosis and neuronal injury: cellular mechanisms and in vivo approach. **PLoS One**, v. 8, 2013.

MATSUI, T. et al. Neurochemical characterization of mouse dorsal root ganglion neurons expressing organic cation transporter 2. **Neuroreport.**, v. 31, n. 3, p. 274-280, 2020.

MAY, B. H. et al. Integrative herbal medicine for chemotherapy-induced peripheral neuropathy and hand-foot syndrome in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Integr Cancer Ther**, v. 18, 2019.

McKEAGE, M. J. et al. Nucleolar damage correlates with neurotoxicity induced by different platinum drugs. **Br J Cancer.**, v. 85, n. 8, p. 1219-1225, 2011.

MENG, J. et al. Duloxetine, a balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, improves painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy by inhibiting activation of p38 MAPK and NF- κ B. **Front Pharmacol**, 2019.

MESSORI, L.; MARZO, T.; MERLINO, A. Interactions of carboplatin and oxaliplatin with proteins: Insights from X-ray structures and mass spectrometry studies of their ribonuclease A adducts. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 153, p. 136–142, 2015.

MEYER, L. et al. Allopregnanolone prevents and suppresses oxaliplatin-evoked painful neuropathy: Multi-parametric assessment and direct evidence. **Pain**, v. 152, n. 1, p. 170–181, 2011.

MIASKOWSKI, C. et al. Chemotherapy-induced neuropathy in cancer survivors. **J Pain Symptom Manag**, v. 54, p. 204-218, 2017.

MIYAKE, T. et al. Distinct mechanism of cysteine oxidation-dependent activation and cold sensitization of human transient receptor potential ankyrin 1 channel by high and low oxaliplatin. **Front. Physiol**, v. 8, p. 878, 2017.

MIZUNO, K. et al. Goshajinkigan, a traditional Japanese medicine, prevents oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy by suppressing functional alteration of TRP channels in rat. **J. Pharmacol. Sci**, v. 125, p. 91–98, 2014.

MOLASSIOTIS, A. et al. Are we mis-estimating chemotherapy-induced peripheral neuropathy? Analysis of assessment methodologies from a prospective, multinational, longitudinal cohort study of patients receiving neurotoxic chemotherapy. **BMC Cancer**, v. 19, n.132, 2019.

MOLS, F. et al. Chemotherapy-induced neuropathy and its association with quality of life among 2- to 11-year colorectal cancer survivors: results from the population-based PROFILES registry. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 21, p. 2699-2707, 2013.

MOLS, F. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its association with quality of life: a systematic review. **Support Care Cancer**, v. 22, n. 8, p. 2261-2269, 2014.

NAGASHIMA M. et al. Efficacy and tolerability of controlled-release oxycodone for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and the extension of FOLFOX therapy in advanced colorectal cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 22, n. 6, p. 1579-1584, 2014.

NAKAGAWA, T. et al.; KANEKO, S. Roles of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 in Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. **Biol Pharm Bull.**, v. 40, n. 7, p. 947-953, 2017.

NASSINI, R. et al. Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation. **Pain**, v. 152, p. 1621–1631, 2011.

NAZIROĞLU, M.; BRAIDY, N. Thermo-sensitive TRP channels: Novel targets for treating chemotherapy-induced peripheral pain. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017.

NISHIDA, K. et al. Ergothioneine ameliorates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in rats. **Life Sci.**, v. 207, p. 516-524, 2018.

NISHIDA, T. et al. Involvement of high mobility group box 1 in the development and maintenance of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in rats. **Toxicology**, v. 365, p. 48-58, 2016.

NISHIOKA, M. et al. The Kampo medicine, Goshajinkigan, prevents neuropathy in patients treated by FOLFOX regimen. **Int J Clin Oncol**, v. 16, n. 4, p. 322-7, 2011.

NOGUEIRA, Francisca Cristiane. **Efeitos gastro- e hepatoprotetor de uma proteína isolada das sementes do noni (*Morinda citrifolia L.*) em camundongos.** Dissertação de Mestrado. Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, 2018.

OLSEN, R. W. Absinthe and γ -aminobutyric acid receptors. **PNAS**, v. 97, p. 4417-4418, 2000.

OOI, L. S. M. et al. Purification and characterization of non-specific lipid transfer proteins from the leaves of *Pandanus marylifolius* (Pandanaceae). **Peptides**, v. 27, p. 626-632, 2006.

OTANI, I. M.; WONG, J.; BANERJI, A. Platinum Chemotherapy Hypersensitivity: Prevalence and Management. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 37, n. 4, p. 663–677, 2017.

OTTAIANO, A. et al. Diabetes and Body Mass Index Are Associated with Neuropathy and Prognosis in Colon Cancer Patients Treated with Capecitabine and Oxaliplatin Adjuvant Chemotherapy. **Oncology**, v. 90, n. 1, p. 36-42, 2016.

OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645–6653, 2018.

PACHMAN, D. R. et al. Clinical Course of Oxaliplatin-Induced Neuropathy: Results From the Randomized Phase III Trial N08CB (Alliance). **J Clin Oncol**, v. 33, n. 30, p. 3416–22, 2015.

PALAPINYO, S. Incidence of oxaliplatin hypersensitivity reaction among colorectal cancer patients: A 5-year retrospective study. **Pharm Pract (Granada)**, v. 20, n. 2, p. 2635, 2022.

PARK, J. H. et al. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via TRPA1 stimulation in mice dorsal root ganglion is correlated with aluminum accumulation. **PLoS One**, v. 10, 2015.

PARK, S. B. et al. Oxaliplatin-induced neurotoxicity: changes in axonal excitability precede development of neuropathy. **Brain: a journal of neurology**, v. 132, n. 10, p. 2712–23, 2009.

PARK, S. B. et al. Neurotoxicidade periférica induzida por quimioterapia: uma análise crítica. **CA Cancer J Clin**, v. 63, n. 6, p. 419–37, 2013.

PARK, S. B.; LIN, C. S.; KIERNAN, M. C. Nerve excitability assessment in chemotherapy-induced neurotoxicity. **J Vis Exp**, v. 26, n. 62, p. 3439, 2012.

PEREIRA, A. F. et al. Amifostine protects from the peripheral sensory neuropathy induced by oxaliplatin in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 53, n. 11, p. 10263, 2020.

PEREIRA, A. F. et al. Endocannabinoid System Attenuates Oxaliplatin-Induced Peripheral Sensory Neuropathy Through the Activation of CB1 Receptors. **Neurotox Res.**, 2021.

PEREIRA, A. F. et al. Metformin reduces c-Fos and ATF3 expression in the dorsal root ganglia and protects against oxaliplatin-induced peripheral sensory neuropathy in mice. **Neuroscience Letters**, v. 709, 2019.

PEREIRA, A. F. et al. Neurotoxic effect of oxaliplatin: Comparison with its oxalate-free analogue cis-[PtII(1R,2R-DACH)(3-acetoxy-1,1-cyclobutanedicarboxylato)] (LLC-1402) in mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 340, p. 77–84, 2018.

PEREIRA, A. F. Papel do oxalato na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos: comparação entre a oxaliplatina e seu análogo livre de oxalato. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

PIKE, C. T. et al. Healthcare costs and workloss burden of patients with chemotherapy-associated peripheral neuropathy in breast, ovarian, head and neck, and nonsmall cell lung cancer. **Chemother Res Pract.**, v. 2012, p. 913848, 2012.

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

PONTES, R. B.; LINO, J. A.; VALE, M. L. Modelo Experimental de Neuropatia Sensitiva Crônica por Oxaliplatina. 1. ed. Beau Bausiin: Novas Edições Acadêmicas, 2018. 133p.

PONTES, R. B. et al. Involvement of endothelin receptors in peripheral sensory neuropathy induced by oxaliplatin in mice. **Neurotoxicity Research**, v. 36, n. 4, p. 688–699, 2019.

POTENZIARI, A. et al. Oxaliplatin-induced neuropathy occurs through impairment of haemoglobin proton buffering and is reversed by carbonic anhydrase inhibitors. **Pain**, v. 161, p. 405–415, 2020.

PULVERS, J. N.; MARX, G. Factors associated with the development and severity of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: a systematic review. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 13, n. 6, p. 345–355, 2017.

RANGEL, G. F. P., et al. Uroprotective effect of a protein isolated from *Morinda citrifolia* seed (McLTP1) on ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in mice. **BioRxiv**, 2023.

RIBEIRO, W. L. C. et al. **Avaliação do efeito nefroprotetor da proteína transferidora de lipídeos isolados das sementes do fruto de *Morinda citrifolia* (McLTP1) em ratos Wistar.** Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, São Paulo, v.4 n.1, pg. 45-81, 2016.

RIDDELL, I. A. Cisplatin and Oxaliplatin: Our Current Understanding of Their Actions. *Met Ions Life Sci.*, v. 18, 2018.

RIDDELL, I. A.; LIPPARD, S. J. Cisplatin and oxaliplatin: Our current understanding of their actions. **Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents**, p. 1–42, 2018.

RILI, G. et al. The role of NFAT in the pathogenesis and targeted therapy of hematological malignancies. **European Journal of Pharmacology**, v. 921, 2022.

RIMOLA, V. et al. Oxaliplatin causes transient changes in TRPM8 channel activity. **Int J Mol Sei**, v. 22, n. 9, p. 4962, 2021.

RIVA, B. et al. Oxaliplatin induces pH acidification in dorsal root ganglia neurons. **Sci. Rep.**, v. 8, p. 15084, 2018.

ROJAS, H.; RITTER, C.; PIZZOL, F. D. Mechanisms of dysfunction of the blood-brain barrier in critically ill patients: emphasis on the role of matrix metalloproteinases. **Rev. bras. ter. intensiva**, v. 23, n. 2, 2011.

SAIF, M. W.; REARDON, J. Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. **The Clin Risk Manag**, v. 1, n. 4, p. 249-58, 2005.

SALAT K. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy-part 2: focus on the prevention of oxaliplatin-induced neurotoxicity. **Pharmacol Rep**, v. 72, n. 3, p. 508-527, 2020.

SCAGLIOTTI, G. V.; VOKES, E. E. 51 - Adjuvant and Neoadjuvant Chemotherapy for Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer. In: Pass HI, Ball D, Scagliotti GV, editors. IASLC Thoracic Oncology (Second Edition) Philadelphia: **Content Repository Only**, p. 512-524, 2018.

SCHUH, K. et al. Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 8, p. 2456-2466, 1998.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SERENO, M. et al. Genetic polymorphisms of SCN9A are associated with oxaliplatin-induced neuropathy. **BMC Cancer**, v. 17, n. 63, 2017.

SERETNY, M. et al. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. **Pain**, v. 155, n. 12, p. 2461-2470, 2014.

SHIGEMATSU, N. et al. Neuroprotective effect of alogliptin on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in vivo and in vitro. **Sci Rep.** v. 10, n. 1, p. 6734, 2020.

SHOU, J. et al. Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment. **Cancer Lett**, 2015.

SIKANDAR S, DICKENSON AH. II. No need for translation when the same language is spoken. **Br J Anaesth.**, v. 111, n. 1, p. 3-6, 2013.

SILVESTRO, S. et al. Use of cannabidiol in the treatment of epilepsy: Efficacy and security in clinical trials. **Molecules**, v. 24, n. 8, 2019.

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

SITTL, R. et al. Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Na(V)1.6-resurgent and persistent current. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 109, p. 6704-6709, 2012.

SMITH E. M. L. et al. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. **JAMA**, v. 309, p. 1359-1367, 2013.

SMITH, E. M. L. et al. Predictors of duloxetine response in patients with oxaliplatin-induced painful chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): a secondary analysis of randomised controlled trial - CALGB/alliance 170601. **Eur J Cancer Care (Engl)**, v. 26, 2017.

SOTOCINA, S. G. et al. The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. **Molecular Pain**, v. 7, p. 1744, 2011.

SOUSA, A. A. *McLTP₁* (*Morinda citrifolia* Lipid Transfer Protein 1): efeito antimicrobiano in vitro e atividade protetora sobre a sepse induzida em camundongos. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará. 2016.

SOUZA, A. A. et al. Antifungal properties of a nonspecific lipid transfer protein from noni (*Morinda citrifolia* L.) seeds. Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Foz do Iguaçu, PR, Brazil, August 24th to 28th, 2015. Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq).

SOUZA, A. A. *McLTP₁* (*Morinda citrifolia* LIPID TRANSFER PROTEIN 1): efeito antimicrobiano in vitro e atividade protetora sobre a sepse induzida em camundongos. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SOUZA, A. A. et al. Lipid transfer protein isolated from noni seeds displays antibacterial activity in vitro and improves survival in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Biochimie**, v. 149, p. 9-17, 2018.

SOVERI, L. M. et al. Long-term neuropathy and quality of life in colorectal cancer patients treated with oxaliplatin containing adjuvant chemotherapy. **Acta Oncol.**, v. 58, n. 4, p. 398-406, 2019.

SPROWL, J. A. et al. A phosphotyrosine switch regulates organic cation transporters. **Nat Commun**, v. 16, n. 7, p. 10880, 2016.

SPROWL, J. A. et al. Oxaliplatin neurotoxicity is dependent on OCT2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 27, p. 11199-11204, 2013.

STAFF, N. P. et al. Platinum-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 24, n. Suppl 2, p. 26-39, 2019.

STAROBOVA, H.; VETTER, I. Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Front Mol Neurosci**, v. 10, n. 174, 2017.

STEIN, A.; ARNOLD, D. Oxaliplatin: A review of approved uses. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 1, p. 125-37, 2012.

STOREY, D. J. et al. Capecitabine combined with oxaliplatin (CapOx) in clinical practice: how significant is peripheral neuropathy? **Ann Oncol**, v. 21, n. 8, p. 1657-1661, 2010.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin.**, v. 71, p. 209-249, 2021.

TADINI-BUONINSEGNI, et al. Translocation of platinum anticancer drugs by human copper ATPases ATP7A and ATP7B. **Angew Chem Int Ed Engl.**, v. 53, n. 5, p. 1297-1301, 2014.

TAÏB, S.; DURAND, J.; BRUNET, I. Neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine - Comment faire barrière ? [Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: how to create a barrier?]. **Med Sci (Paris)**, v. 36, n. 1, p. 33-37, 2020.

TALEB, O. et al. Behavioral and electromyographic assessment of oxaliplatin-induced motor dysfunctions: Evidence for a therapeutic effect of allopregnanolone. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 440–449, 2017.

TAMURA, K. et al. TRPM8-mediated cutaneous stimulation modulates motor neuron activity during treadmill stepping in mice. **J Physiol Sci.**, v. 69, n. 6, p. 931-938, 2019.

TANISHIMA, H. et al. Hyperacute peripheral neuropathy is a predictor of oxaliplatin-induced persistent peripheral neuropathy. **Supportive Care in Cancer**, v. 25, n. 5, p. 1383–1389, 2017.

TASSIN-MOINDROT, et al. The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. Solution structure of a complex with prostaglandin B2. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 4, p. 1117-11124, 2000.

TATSUSHIMA, Y. et al. Calcium channel blockers reduce oxaliplatin-induced acute neuropathy: a retrospective study of 69 male patients receiving modified FOLFOX6 therapy. **Biomed Pharmacother**, v. 67, n. 1, p. 39-42, 2013.

TERRAZZINO, S. et al. Genetic determinants of chronic oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: a genome-wide study replication and meta-analysis. **J Peripher Nerv Syst**, v. 20, n. 1, p. 15-23, 2015.

TESNIERE, A. et al. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. **Oncogene**, v. 29, n. 4, p. 482-91, 2010.

TOFTHAGEN, C. et al. Usability and Acceptability of a Web-Based Program for Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Comput Inform Nurs.**, v. 34, n. 7, p. 322-329, 2016.

TOFTHAGEN, C. et al. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy's effects on health-related quality of life of colorectal cancer survivors. **Support Care Cancer**, v. 21, n. 12, p. 3307-3313, 2013.

TOYAMA, S. et al. Characterization of acute and chronic neuropathies induced by oxaliplatin in mice and differential effects of a novel mitochondria-targeted antioxidant on the neuropathies. **Anesthesiology**, v. 120, n. 2, p. 459-73, 2014.

TRAN, H. C. et al. Oxaliplatin and doxorubicin for relapsed or refractory high-risk neuroblastoma. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 32, n. 1, p. 26–31, 2015

TRECARICHI, A.; FLATTERS, S. J. L. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Int Rev Neurobiol.**, v. 145, p. 83-126, 2019.

TREVISAN, G. et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. **Brain**, v. 139, n. 5, p. 1361-1377, 2016.

TREVISAN, G. et al. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. **Cancer Res.**, v. 73, n. 10, p. 3120-3131, 2013.

TSUBOTA, M. et al. Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants. **J Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 199, 2019.

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

ULRICH, M.; WISSENBACH, U.; THIEL, G. The super-cooling compound icilin stimulates c-Fos and Egr-1 expression and activity involving TRPM8 channel activation, Ca²⁺ ion influx and activation of the ternary complex factor Elk-1. **Biochem Pharmacol.**, 2020.

USHIO, S. et al. Goshajinkigan reduces oxaliplatin-induced peripheral neuropathy without affecting antitumor efficacy in rodents. **EUR. J. Cancer** , v. 48 , p. 1407-1413, 2012.

VAN WINKLE, R. C.; CHANG, C. The biochemical basis and clinical evidence of food allergy due to lipid transfer proteins: a comprehensive review. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 46, n. 3, p. 211-224, 2014.

VAN WINKLE, R.C.; CHANG, C. The biochemical basis and clinical evidence of foodallergy due to lipid transfer proteins: a comprehensive review. **Clin. Rev. Allergy Immunol**, v. 46, p. 211–224, 2014.

VAN, A. J. W. et al. Medical interventions for the prevention of platinum-induced hearing loss in children with cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 1, n. 7, 2014.

VELASCO, R. et al. Reliability and accuracy of quantitative sensory testing for oxaliplatin induced neurotoxicity. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 131, n. 5, p. 282–289, 2015.

VELASCO, R., BRUNA, J. Oxaliplatin Neurotoxicity. **Curr Colorectal Cancer Rep**, v. 10, p. 303-312, 2014.

VISSERS, K.; MEERT, T. A behavioral and pharmacological validation of the acetone spray test in gerbils with a chronic constriction injury. **Anesth Analg**, v. 2, p. 457–464, 2005.

VYMAZAL, O. et al. Immunosuppression Affects Neutrophil Functions: Does Calcineurin-NFAT Signaling Matter? **Front Immunol.**, v. 12, 2021.

WANG, W. et al. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor 2 attenuates chemotherapy-induced neuropathy. **J Biol Chem**. 2019.

WANG, X. S. et al. Minocycline for Symptom Reduction During Oxaliplatin-Based Chemotherapy for Colorectal Cancer: A Phase II Randomized Clinical Trial. **J Pain Symptom Manage**, v. 58, n. 4, p. 662-671, 2019.

WANG, Y. SONG et al. Melatonin attenuates pain hypersensitivity and decreases astrocyte mediated spinal neuroinflammation in a rat model of oxaliplatin-induced pain. **Inflammation**, v. 40, n. 6, p. 2052–2061, 2017

WASEEM, M.; PARVEZ, S. Neuroprotective activities of curcumin and quercetin with potential relevance to mitochondrial dysfunction induced by oxaliplatin. **Protoplasma**, v. 253, p. 417-430, 2016.

WEI, G. et al. Platinum accumulation in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. **J Peripher Nerv Syst.**, 2021.

WEI, K.; ZHONG, X. Non-specific lipid transfer proteins in maize. **BMC Plant Biol**, v. 14, p. 281, 2014.

WERNECK, M. B. et al. NFAT1 transcription factor is central in the regulation of tissue microenvironment for tumor metastasis. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, n. 4, p. 537-546, 2011.

WU, B. Y. et al. A review of complementary therapies with medicinal plants for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Complement Ther Med**, v. 42, p. 226–32, 2019.

XANTHOUDAKIS, S. An enhanced immune response in mice lacking the transcription Factor NFAT1. v. 272, 1996.

XIAO, W. H.; BENNETT, G. J. Effects of mitochondrial poisons on the neuropathic pain produced by the chemotherapeutic agents, paclitaxel and oxaliplatin. **Pain**, v. 153, n. 3, p. 704-709, 2012.

XIE, X. et al. Tegaserod maleate exhibits antileukemic activity by targeting TRPM8. **Biomed Pharmacother.**, v. 154, p. 113566, 2022.

XU, D. et al. Participation of pro-inflammatory cytokines in neuropathic pain evoked by chemotherapeutic oxaliplatin via central GABAergic pathway. **Molecular Pain**, v. 14, 2018.

YAMAKURA, F.; IKEDA, K. Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. **Nitric Oxide**, v. 14, n. 2, p. 152-161, 2006.

YAMAMOTO, K. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 that is induced in dorsal root ganglion neurons contributes to acute cold hypersensitivity after oxaliplatin administration. **Mol Pain**, v. 11, p. 69, 2015.

YAMAMOTO, S. et al. Excessive spinal glutamate transmission is involved in oxaliplatin-induced mechanical allodynia: a possibility for riluzole as a prophylactic drug. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9661, 2017.

YAN, F. et al. Role of platinum DNA damage-induced transcriptional inhibition in chemotherapy-induced neuronal atrophy and peripheral neurotoxicity. **J Neurochem.**, v. 135, n. 6, p. 1099-1112, 2015.

YANG, Y. et al. Nrf2 inhibits oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via protection of mitochondrial function. **Free Radic Biol Med.**, v. 120, p. 13-24, 2018.

YONEZAWA, A. Platinum agent-induced nephrotoxicity via organic cation transport system. **Yakugaku Zasshi**, v. 132, n. 11, p. 1281-1285, 2012.

ZAJACZKOWSKA, R. et al. Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, 2019.

ZANVILLE, N. R. et al. Evaluating the impact of chemotherapy-induced peripheral neuropathy symptoms (CIPN-sx) on perceived ability to work in breast cancer survivors during the first year post-treatment. **Support Care Cancer.**, v. 24, n. 11, p. 4779-4789, 2016.

ZHANG, Q. Y. et al. Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. **Front Pharmacol**, v. 9, n. 1253, 2018.

ZHANG, S. et al. Nuclear factor of activated T cells regulates neutrophil recruitment, systemic inflammation, and T-cell dysfunction in abdominal sepsis. **Infect Immun.**, v. 82, n. 8, p. 3275-3288, 2014.

ZHANG, Y. et al. The role of NFAT2/miR-20a-5p signaling pathway in the regulation of CD8(+) naïve T cells activation and differentiation. **Immunobiology**, 2021.

ZHAO M, et al. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. **Mol Pain**, v. 28, n. 8, p. 55, 2012.

ZHAO, M. et al. Pharmacological characterization of standard analgesics on oxaliplatin-induced acute cold hypersensitivity in mice. **J. Pharmacol. Sci**, v. 124, p. 514-517, 2014.

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

ZHOU, L. et al. Monosialotetrahexosylganglioside in the treatment of chronic oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity: TJMUCH-GI-001, a randomised controlled trial. **EClinicalMedicine**, v. 41, p. 101157, 2021.

ZHUO, M.; GORGUN, M. F.; ENGLANDER, E. W. Translesion synthesis DNA polymerase kappa is indispensable for DNA repair synthesis in Cisplatin exposed dorsal root ganglion neurons. **Mol. Neurobiol**, v. 55, p. 2506–2515, 2018.

ZIMMERMAN, C. et al. MC11C4: a pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study of venlafaxine to prevent oxaliplatin-induced neuropathy. **Support Care Cancer**, v. 24, n. 3, p. 1071-1078, 2016.

ZOTTICH, U. et al. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, n. 4, p. 375-383, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA – UFC



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITO DA PROTEÍNA DE TRANSFERÊNCIA LIPÍDICA ISOLADA DE SEMENTES DE *MORINDA CITRIFOLIA* (NONI) NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS”, protocolo 36/17, sob responsabilidade de Profa. Dra. Mariana Lima Vale, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 27 de junho de 2017.

Vigência do projeto	29/06/2017 à 20/04/2020
Espécie/Linhagem	Camundongo Swiss
Nº de Animais	170
Peso	25 g a 30 g (6 semanas)
Sexo	Machos (160 animais) / Fêmeas (10 animais)
Origem	Biotério Central da UFC

Alexandre Havt Bindá

Fortaleza, 29 de junho de 2017

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 ALEXANDRE HAVT BINDÁ

COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO COM ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1666987