



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

BRENO LEONARDO DA SILVA MANSUR ABUCATER

COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA DA PROTEÍNA $M\epsilon LTP_1$ E OXALIPLATINA NA
ATIVIDADE ANTITUMORAL E NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFERICA EM
MODELO DE CÂNCER DE COLORRETAL.

FORTALEZA

2025

BRENO LEONARDO DA SILVA MANSUR ABUCATER

COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA DA PROTEÍNA *McLTP₁* E OXALIPLATINA NA
ATIVIDADE ANTITUMORAL E NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFERICA EM
MODELO DE CÂNCER DE COLORRETAL.

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia
da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.
Orientadora: Profa. Dra. Mariana
Lima Vale.

FORTALEZA

2025

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)

A151c Abucater, Breno Leonardo da Silva Mansur.
Combinação terapêutica da proteína McLTP1 e oxaliplatina na atividade antitumoral e na neuropatia sensitiva periférica em modelo de câncer de colorretal / Breno Leonardo da Silva Mansur Abucater. – 2025.
107 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.

1. McLTP1. 2. Oxaliplatina. 3. Neuropatia . 4. CT26.WT. I. Título.

CDD 615.1

BRENO LEONARDO DA SILVA MANSUR ABUCATER

COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA DA PROTEÍNA *McLTP₁* E OXALIPLATINA NA
ATIVIDADE ANTITUMORAL E NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFERICA EM
MODELO DE CÂNCER DE COLORRETAL.

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

Aprovada em 28 Janeiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Mariana Lima Vale (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dr^ª. Marta Chagas Monteiro
Universidade Federal do Pará - UFPA

DEDICATÓRIA

*A minha Mãe Ana Ilce por todo a,
incondicional na minha vida*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar e proteger, sempre me abençoando e dando força nos dias difíceis.

À minha família, que me apoia e me deu condições de perseguir meus objetivos em especial, à minha mãe **Ana Ilce** que não mediu esforços para me ajudar nessa caminhada, sempre me dando muito amor, conselhos, força e sem sua ajuda eu não teria conseguido chegar até o final. Ao meu irmão Bruno Alexandre que sempre que possível me ajudou nos momentos de dificuldade.

À minha orientadora, professora Mariana Vale pela orientação e dedicação ao longo de toda a minha jornada.

Aos companheiros de laboratório e amigos: Jonas, Renata, Bianca, Isabele, Ana Maria, Débora, Gisely, Ariana, Jussara e Liviane por toda ajuda na condução dos experimentos e à Francisco Rafael, pelo incentivo de ingressar na pós graduação, Á Gabriela Mariangela (veterinária), Deomar e Laura (secretaria) que sempre tiveram uma palavra de apoio e esperança e a professora Roberta Jeane que sempre acreditou no meu potencial e trabalho.

Aos alunos de iniciação científica que fizeram parte do meu projeto: Ellen, Bianca, Marcos, Ligia e Daniel, que não mediram esforços para realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de cursar uma pós graduação.

Ao Laboratório de farmacologia da inflamação e do câncer (LAFICA), pela oportunidade de desenvolver minha pesquisa.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo do apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

EPÍGRAFE

*“Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo propósito
debaixo do céu Há tempo de nascer, e
tempo de morrer; tempo de plantar, e
tempo de arrancar o que se plantou.”*

(Eclesiastes 3:1-2).

RESUMO

COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA DA PROTEÍNA *McLTP₁* e OXALIPLATINA NA ATIVIDADE ANTITUMORAL E NA NEUROPATIA SENSITIVA PERIFÉRICA EM MODELO DE CÂNCER DE COLORRETAL.

A oxaliplatina (OXL) é um antineoplásico, utilizada como a 1ª linha de tratamento do câncer de colorretal (2º lugar em incidência no Brasil), de extrema importância na clínica oncológica. Possui como principal efeito adverso a neuropatia sensitiva periférica (NSP), uma condição neurotóxica debilitante e dolorosa que pode levar a suspensão do tratamento ou diminuição da dose, diminuindo a sobrevida dos pacientes com CCR. Estudos demonstram que uma proteína purificada da semente de *Morinda citrifolia* (*McLTP₁*) tem propriedade analgésica e antiinflamatória e preveniu a NSP induzida por OXL em camundongos Swiss. Ainda não existe terapia validada para a prevenção ou tratamento da NSP por OXL e é de interesse que as propostas terapêuticas tenham efeito antineuropático e ao mesmo tempo não diminuam o efeito antitumoral do antineoplásico. Assim, o objetivo foi avaliar o efeito da *McLTP₁* na atividade antitumoral da OXL e na NSP associada em animais com tumor de células de adenocarcinoma colorretal murino CT26.WT. Para isso, foi induzido tumor com linhagem CT26.WT ($0,25 \times 10^5$ células/animal), no flanco por via subcutânea em camundongos BALB/c machos (20 a 25g), provenientes do biotério do NPDM-UFC. Após 10 dias da inoculação, os animais foram divididos em 4 grupos: controle (tratado com o veículo da OXL), grupo tratado com *McLTP₁* (4mg/kg; v.o; diariamente), grupo OXL (6 mg/kg.iv; a cada 48 h) e grupo *McLTP₁* + OXL. O crescimento tumoral foi acompanhado até o 14º dia. A NSP foi avaliada pelos testes de alodinia mecânica e térmica. Ao final do experimento os camundongos foram eutanasiados, foi coletado sangue periférico para realização de leucometria e o tumor para avaliação do peso úmido e ensaio de imunofluorescência para Ki67, CD31 e HMGB1. Adicionalmente, foi avaliada a citotoxicidade, *in vitro*, da *McLTP₁* isolada e em combinação com OXL. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT. A linhagem CT26.WT foi exposta às concentrações de *McLTP₁* de (0,024 à 200 µM) por 48 a 72 h. Após determinar a IC₅₀ da *McLTP₁*, foi realizada uma curva da OXL isoladamente (0,39 µM até 20 µM) e outra curva em associação com a *McLTP₁* em uma concentração fixa (IC₅₀). Os resultados mostraram que *McLTP₁* inibiu o desenvolvimento da NSP causada por OXL, diminuindo a alodinia mecânica em até 96,8% (p<0,001) e a alodinia ao frio 85,2% (p<0,001). Na avaliação do efeito antitumoral a *McLTP₁* e OXL diminuíram o tamanho do tumor em 51,1% e 81,3% (p<0,001), respectivamente e o peso do tumor em 76,1% (p<0,05). A associação de *McLTP₁*+OXL diminuiu em 63% e 78% (p<0,001) o tamanho e o peso do tumor. Não houve diferença entre o grupo OXL e o grupo tratado com a combinação (OXL+*McLTP₁*). Todos os tratamentos inibiram a marcação para Ki67 e CD31. A marcação para HMGB1 foi aumentada em todos os grupos tratados. *McLTP₁* aumentou o efeito da OXL sobre este marcador. A OXL diminuiu o número total de leucócitos, principalmente os linfócitos (89,5%) quando comparado ao controle (p<0,05). Esse efeito foi prevenido pela *McLTP₁* em 78,8% (p<0,01). *In vitro*, OXL diminuiu a viabilidade celular com IC₅₀ de 1,74, 2,6 e 0,75µM após 48, 72 e 96h de incubação. *McLTP₁* apresentou uma IC₅₀ de 104,7, 44,12 e 23,6µM no mesmo período. A associação de *McLTP₁* com OXL baixou a IC₅₀ para 1,35 e 0,24 µM nos tempo de 72 e 96 h (p<0,05) demonstrando efeito potenciador. Os resultados são promissores tendo em vista o potencial da *McLTP₁* como adjuvante na terapia do câncer colorretal com OXL tanto pelo seu efeito neuroprotetor e também antitumoral.

Palavras-chave: Oxaliplatina; Câncer colorretal; Proteína de Transferência Lipídica, *Morinda citrifolia*

ABSTRACT

THERAPEUTIC COMBINATION OF *McLTP*₁ PROTEIN AND OXALIPLATIN IN ANTITUMOR ACTIVITY AND PERIPHERAL SENSORY NEUROPATHY IN A COLORECTAL CANCER MODEL.

Oxaliplatin (OXL) is 3rd generation platinum based antineoplastic drug, used as the 1st line of treatment for colorectal cancer (2nd place in incidence in Brazil), of extreme importance oncology, whose main effect is collateral peripheral sensory neuropathy (PNS), a debilitating and painful neurotoxic condition that can lead to treatment suspension or dose reduction, therefore decreasing CRC patient survival. Studies demonstrate that a protein purified from the seed of *Morinda citrifolia* (*McLTP*₁) has analgesic and anti-inflammatory properties and prevented OXL-induced NSP in Swiss mice. There is still no validated therapy for the prevention or treatment of NSP by OXL and it is of interest that therapeutic proposals have an anti-neuropathic effect and at the same time do not reduce the antitumor effect of the antineoplastic drug. Thus, the objective of this work was evaluate the effect of *McLTP*₁ on the antitumor activity of oxaliplatin and on the associated NSP in animals with murine colorectal adenocarcinoma cell tumor CT26.WT. For this, male BALB/c mice (20 to 25g), from the NPDM-UFC animal facility, were inoculated subcutaneously in the flank with the CT26.WT cells (0.25 x10⁵ cells/animal). 10 days after inoculation, the animals were divided into 4 groups: control (treated with the OXL vehicle), group treated with *McLTP*₁ (4mg/kg; p.o; daily), OXL group (6 mg/kg.iv; every 48 hours) and group *McLTP*₁ +OXL. Tumor growth was monitored daily until the 14th day. NSP was assessed by mechanical and thermal allodynia tests. At the end of the experiment, the mice were euthanized, peripheral blood was collected for leukometry and the tumor was collected for wet weight assessment and immunofluorescence assay for Ki67, CD31 and HMGB1. Additionally, the *in vitro* cytotoxicity of *McLTP*₁ alone and in combination with OXL was assessed by the MTT colorimetric assay. The CT26.WT cells were exposed to increasing concentrations of *McLTP*₁ (0.024 to 200 µM) for 48 to 72 hours. After determining the IC₅₀ of *McLTP*₁, a curve was performed for OXL alone (0.39 µM to 20 µM) and another curve in association with *McLTP*₁ at a fixed concentration (IC₅₀). The results showed that treatment with *McLTP*₁ inhibited the development of NSP caused by OXL, reducing mechanical allodynia by up to 96.8% (p<0.001) and cold allodynia by 85.2% (p<0.001). In evaluating the antitumor effect, *McLTP*₁ and OXL decreased tumor size by 51.1% and 81.3% (p<0.001), respectively, and tumor weight by 76.1% (p<0.05). The association of *McLTP*₁+OXL reduced tumor size and weight by 63% and 78% (p<0.001). There was no difference between the group treated with OXL and the group treated with the combination (OXL+ *McLTP*₁). All treatments inhibited tumoral labeling for Ki67 and CD31. HMGB1 labeling was increased in all treated groups. *McLTP*₁ increased the effect of OXL on this marker. OXL decreased the total number of leukocytes, especially lymphocytes (89.5%) when compared to the control (p<0.05). This effect was prevented by *McLTP*₁ in 78.8% (p<0.01). *In vitro*, OXL decreased cell viability with IC₅₀ of 1.74, 2.6 and 0.75µM after 48, 72 and 96h of incubation. *McLTP*₁ presented an IC₅₀ of 104.7, 44.12 and 23.6µM in the same period. The association of *McLTP*₁ with OXL lowered the IC₅₀ to 1.35 and 0.24 µM at 72 and 96 h (p<0.05), demonstrating a potentiating effect. The results are promising considering the potential of *McLTP*₁ as an adjuvant in colorectal cancer therapy with OXL for both its neuroprotective and antitumor effects.

Keywords: Oxaliplatin; Colorectal Cancer; Lipid Transfer Protein, *Morinda citrifolia*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO 1 Estimativa do INCA de novos casos de câncer em homens e mulheres até o ano de 2025.	20
ILUSTRAÇÃO 2: Estágio do câncer de colorretal.	22
ILUSTRAÇÃO 3: Mecanismos de Ação da Oxaliplatina por citotoxicidade direta.....	27
ILUSTRAÇÃO 4 : Mecanismos de Ação da Oxaliplatina por morte celular imunogênica	29
ILUSTRAÇÃO 5: Manifestação da NPS por Oxaliplatina.	30
ILUSTRAÇÃO 6: Fruto e Árvore da <i>Morinda citrifolia</i> L.....	35
ILUSTRAÇÃO 7: Fluxo do cultivo celular.	45
ILUSTRAÇÃO 8: Inoculação das células CT26.WT. e avaliação do crescimento tumoral.....	46
ILUSTRAÇÃO 9: Fluxograma da Extração da <i>McLTP₁</i> (4mg/kg).....	48
ILUSTRAÇÃO 10: Desenho experimental.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Efeito citotóxico e cálculo da IC ₅₀ da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 48h.	56
FIGURA 2. Efeito citotóxico da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 48h.	57
FIGURA 3. Efeito citotóxico e cálculo da IC ₅₀ da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 72h.	59
FIGURA 4. Efeito citotóxico da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 72h.	60
FIGURA 5. Efeito citotóxico e cálculo da IC ₅₀ da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 96h.	62
FIGURA 6. Efeito citotóxico da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 96h.	63
FIGURA 7 - Avaliação da alodínia mecânica plantar em camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com oxaliplatina, <i>McLTP</i> ₁ e com a associação de ambas por 14 dias.	65
FIGURA 8 - Avaliação da alodínia térmica pelo frio em camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com oxaliplatina, <i>McLTP</i> ₁ e com a associação de ambas por 14 dias.	66
FIGURA 9: Avaliação do efeito da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação de ambas na cinética do volume tumoral em camundongos com tumor de células CT26.WT.	68
FIGURA 10. Avaliação do efeito da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação de ambas no peso úmido tumoral em camundongos com tumor de células CT26.WT.	69
FIGURA 11 Avaliação do peso corporal de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina, <i>McLTP</i> ₁ ou combinação de ambas por 14 dias. ..	70
FIGURA 12 - Avaliação da leucometria total em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e <i>McLTP</i> ₁ ou combinação de ambas por 7 (A) e 14 dias (B).	72
FIGURA 13 - Avaliação da leucometria diferencial em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e <i>McLTP</i> ₁ ou combinação de ambas por 7 (A) e 14 dias (B).	74
FIGURA 14 - Efeito da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação de ambas na marcação para Ki67 em tumor CT26.WT de camundongos 7º dia pós-tratamento.	77
FIGURA 15 - Fotomicrografias representativas da expressão de Ki67 em amostras tumorais de camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com <i>McLTP</i> ₁ , Oxaliplatina ou com a combinação da ambas	78

FIGURA 16- Efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas na marcação para CD31 em tumor CT26.WT de camundongos 7º dia pós-tratamento. 79

FIGURA 17 – Fotomicrografias representativas da expressão de CD31 em amostras tumorais de camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com *McLTP*₁, Oxaliplatina ou com a combinação da ambas 80

FIGURA 18- Efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas na marcação para HMGB1 em tumor CT26.WT de camundongos 7º dia pós-tratamento. 81

FIGURA 19 – Fotomicrografias representativas da expressão de HMGB1 em amostras tumorais de camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com *McLTP*₁, Oxaliplatina ou com a combinação da ambas 82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores da contagem total e diferencial de leucócitos em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e McLTP 1 ou combinação de ambas por 7 dias..... 75

TABELA 2: Valores da contagem total e diferencial de leucócitos em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e McLTP 1 ou combinação de ambas por 14 dias..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATF3** Fator de Transcrição Ativador 3
- CCR** Câncer colorretal
- CD31** Cluster de Diferenciação 31
- CEUA** Comissão de Ética no Uso de Animais
- CTLA-4** Proteína 4 Associada ao Linfócito T Citotóxico
- DACH** Diaminociclohexano
- DAMP** Padrão Molecular Associado a Danos
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DNA** Ácido desoxirribonucleico
- DRG** – Ganglio da raiz dorsal
- EGFR** Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
- FOLFOX** 5-Fluorouracil, leucovorin e oxaliplatina
- HM** Hiperalgia mecânica
- HMGB1** Proteína de Alta Mobilidade do Grupo Caixa 1
- IL** Interleucina
- INCA** Instituto Nacional do Câncer.
- McLTP₁** Proteína Transferidora de Lipídeos isolada das sementes de *Morinda citrifolia*
- NLRP3** Receptor da Família NOD com Domínio de Pirina 3
- OCT2**- Transportador de Cátions Orgânicos 2
- OIPN** - Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia (*Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy*)
- OXL** Oxaliplatina
- PBS** Solução salina tamponada com Fosfato
- PD-1** Programmed Cell Death Protein 1
- PD-L1** Ligante 1 da Morte Programada
- PFA** Paraformaldeído
- TLR4** Toll- like receptor 4
- TRP** Receptores de Potencial Transitório
- TRPA1** Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
- TRPM8** Receptor de Potencial Transitório Melastatina 8
- UFC** Universidade Federal do Ceará.
- VEGF** Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

XELOX Capecitabina e oxaliplatina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Câncer colorretal.....	19
2.3 Tratamento farmacológico do câncer colorretal.....	23
2.4 Oxaliplatina.....	25
2.5 Mecanismos de ação da oxaliplatina.....	25
2.6 Toxicidade e efeitos adversos da oxaliplatina.....	29
2.7 <i>Morinda citrifolia</i> L.....	33
2.8 Proteína de Transferência Lipídica isolada das sementes de <i>Morinda citrifolia</i> - <i>McLTP1</i>	35
3. JUSTIFICATIVA.....	39
4. OBJETIVOS.....	41
4.1 Geral.....	41
4.2 Específicos:.....	41
5. MATERIAIS E METODOS.....	41
5.1 Células CT26.WT.....	41
5.2 Ensaio de citotoxicidade, in vitro, em células CT26.WT: Curva concentração resposta da Oxaliplatina e <i>McLTP1</i>	42
5.3 Ensaio de citotoxicidade in vitro em células CT26.WT: avaliação da combinação de <i>McLTP1</i> com concentrações crescentes de oxaliplatina.....	42
5.4 Ensaio MTT.....	42
5.5 Animais e Aspectos éticos.....	43
5.2 Preparo das células CT26WT para inoculação em camundongos.....	44
5.3 Inoculação das células e avaliação do crescimento tumoral.....	45
5.4 Protocolo de preparo e administração de oxaliplatina.....	46
5.5 Extração, purificação e obtenção da proteína <i>McLTP1</i>	46
5.6 Protocolos experimentais, grupos e desenho de estudo.....	49
5.6.1 Grupos experimentais.....	49
5.6 Avaliação da NSP - testes comportamentais.....	50
5.7.1 Alodínia mecânica plantar.....	50
5.7.2 Alodínia térmica pelo frio.....	50
5.8 Coleta e processamento das amostras tumorais.....	51
5.9 Leucometria total e diferencial em sangue periférico.....	52
5.10 Expressão de Ki67, CD31, HMGB1 em tecido tumoral.....	53
5.11 Análise das imagens de imunofluorescência.....	53
5. 15 Análise estatística.....	54
6. RESULTADOS.....	55

6.1 Avaliação do efeito citotóxico, in vitro nos tempos de 48 horas, 72 horas e 96 horas.....	55
6.2 Avaliação da alodínia mecânica plantar em camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina, <i>McLTP</i> ₁ e com a associação de ambas.	64
6.3 Avaliação da alodínia térmica pelo frio em camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina, <i>McLTP</i> ₁ e com a associação de ambas.	66
6.4 Avaliação do efeito da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação de ambas no crescimento tumoral em camundongos com tumor de células CT26.WT	67
6.5 Avaliação do peso corporal de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e <i>McLTP</i> ₁ ou combinação de ambas.	70
6.5 Avaliação da leucometria total em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e <i>McLTP</i> ₁ ou combinação de ambas por 7 e 14 dias.	71
6.7 Avaliação da leucometria diferencial em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e <i>McLTP</i> ₁ ou combinação de ambas	73
6.8 Avaliação do efeito da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação de ambas na expressão de Ki67 em tumores de células CT26.WT	76
6.9 Avaliação do efeito da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação de ambas na expressão de CD31 em tumores de células CT26.WT	79
6.10 Avaliação do efeito da <i>McLTP</i> ₁ , oxaliplatina e da combinação de ambas na expressão de HMGB1 em tumores de células CT26.WT	81
7 DISCUSSÃO.....	83
8 CONCLUSÃO.....	94
9 REFERÊNCIAS	95
ANEXO I – Certificado de aprovação CEUA NPDM	106
ANEXO II – Certificado de análise da linhagem de células CT26.WT	107

1. INTRODUÇÃO

Um estudo publicado em junho de 2024 no periódico internacional *the Lancet* destacou que o câncer colorretal foi o terceiro mais diagnosticado no mundo em 2020, com cerca de 2 milhões de novos casos. Em consonância com esse elevado número de incidências, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou que, em 2024, surgiriam aproximadamente 40 mil novos casos no Brasil, sendo 2.500 no estado do Ceará e 1.500 no município de Fortaleza (SESA, 2024).

Nos últimos anos, os avanços no tratamento do câncer colorretal têm sido notáveis, com destaque para o desenvolvimento da imunoterapia, que revolucionou as abordagens terapêuticas. A imunoterapia visa estimular o sistema imunológico a reconhecer e atacar células cancerígenas. Um dos mecanismos centrais dessa terapia envolve os inibidores de checkpoint imunológico, como os anticorpos que bloqueiam as proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4, que geralmente "desligam" a resposta imune contra o tumor. Esses inibidores ajudam a restaurar a capacidade do sistema imunológico de combater as células tumorais, mostrando resultados promissores, especialmente em pacientes com tumores colorretais com altas taxas de mutações no DNA (SAMPAIO et al, 2023).

Apesar dos avanços da imunoterapia, a oxaliplatina continua sendo um dos principais quimioterápicos no tratamento adjuvante do câncer colorretal. A oxaliplatina, frequentemente usada em combinação com outros agentes como o 5-fluorouracil, permanece um pilar fundamental no tratamento, pois é eficaz no controle do câncer e na prevenção de recidivas, particularmente em estágios avançados da doença. Embora novas terapias imunológicas se mostrem como grandes promessas, a oxaliplatina continua desempenhando um papel essencial, combinando-se com terapias imunológicas para maximizar os benefícios terapêuticos, conforme destacado em estudos recentes publicados na revista *The Lancet* em 2024 (ENG *et al.*, 2024).

A neuropatia sensitiva periférica (NSP), frequentemente associada a tratamentos com a quimioterapia com oxaliplatina, surge como uma complicação debilitante que afeta diretamente o bem-estar dos pacientes. Estudos mostram que até 85% dos pacientes tratados com oxaliplatina podem desenvolver NSP, o que pode ser um fator importante de comprometimento da qualidade de vida (CHENG *et al.*, 2023).

Os sintomas da NSP como dor, formigamento e perda de sensibilidade, podem comprometer a capacidade do paciente de realizar atividades cotidianas, tornando-se um

fator crucial para a desistência do tratamento. Em muitos casos, o tratamento tem que ser substituído, devido ao desconforto causado pela neuropatia, o que pode comprometer a eficácia do tratamento e as chances de cura do câncer (MARTIN, 2011).

Estudar a neuropatia sensitiva periférica nesse contexto é essencial, pois permite identificar formas de prevenir ou minimizar seus efeitos, garantindo que os pacientes permaneçam no tratamento necessário para combater a doença. Atualmente, grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) está dedicando esforços ao estudo da *McLTP₁*, uma proteína purificada a partir de sementes do fruto da *Morinda citrifolia* (CAMPOS *et al.*, 2016), no que diz respeito aos seus efeitos antinociceptivos e neuroprotetores no modelo de neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina (CESARIO, 2023). Essa proteína tem uma boa estabilidade térmica e atividade biológica tanto por via parenteral como por via oral, o que a torna relevante em termos clínicos. Tem se demonstrado que a *McLTP₁* possui efeitos antiinflamatórios, antibacteriano, gastroprotetor, cicatrizante em modelos experimentais, inclusive inibindo a mucosite intestinal provocada por irinotecano, outro quimioterápico utilizado no tratamento do câncer colorretal (CAMPOS *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018; DO CARMO *et al.*, 2022). Outros autores avaliaram seu efeito *in vitro* contra linhagens celulares de câncer com resultados promissores (LUTIF, 2015).

Seguindo essa premissa, a presente pesquisa buscou expandir o entendimento verificando seu potencial, *in vivo e in vitro*, com o objetivo de estudar o seu efeito no tumor de células de adenocarcinoma colorretal e o efeito de sua combinação com a oxaliplatina, avaliando a interferência no efeito antineoplásico deste quimioterápico, bem como na NSP associada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer colorretal

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo, figurando como uma das principais causas de morte e correspondendo à primeira ou à segunda causa de morte prematura, antes dos 70 anos na maioria dos países (SANTOS, M. O. *et al.*, 2023). Dentre os tipos de câncer, no Brasil, o câncer de colon e reto está entre os mais prevalentes, alcançando o segundo lugar de incidência em homens e mulheres (INCA, 2022). Estudos recentes divulgados pela revista THE LANCET no ano de 2024

mostram que a prevalência tem acometidos pacientes mais novos com menos de 50 anos de idade, gerando uma preocupação crescente com relação a seu tratamento e rastreamento nesta população (ENG *et al.*, 2024).

A ILUSTRAÇÃO 1, representa a estimativa de novos casos de câncer, exceto o câncer de pele não melanoma, em homens e mulheres até o ano de 2025 feito pelo INCA.

ILUSTRAÇÃO 1 Estimativa do INCA de novos casos de câncer em homens e mulheres até o ano de 2025.



Fonte: INCA, 2022.

O câncer de cólon e reto abrange os tumores que se iniciam na parte do intestino grosso, chamada cólon, no reto, que corresponde ao final do intestino imediatamente antes do ânus, e no ânus. É uma doença heterogênea, que se desenvolve predominantemente a partir de mutações genéticas em lesões benignas, como pólipos adenomatosos e serrilhados (SULLIVAN *et al.*, 2022).

O câncer colorretal está relacionado a uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Dentre os principais fatores de risco, estão o histórico familiar de câncer colorretal, uma dieta com baixa ingestão de fibras e folato e alta em gorduras e carnes vermelhas, além de hábitos como tabagismo, a falta de atividade física, obesidade, diabetes e doenças inflamatórias intestinais (AL-SOHAILY *et al.*, 2012; DYSON; RUTTER, 2012).

A maior parte dos casos de câncer colorretal se origina de pólipos adenomatosos, que são lesões inicialmente benignas, mas que têm o potencial de se tornar malignas. Estima-se que cerca de 5% desses pólipos evoluam para câncer dentro de um período de cinco a dez anos. Entre as neoplasias malignas, o câncer colorretal é particularmente influenciado por alterações genéticas em seu processo de desenvolvimento. Cerca de

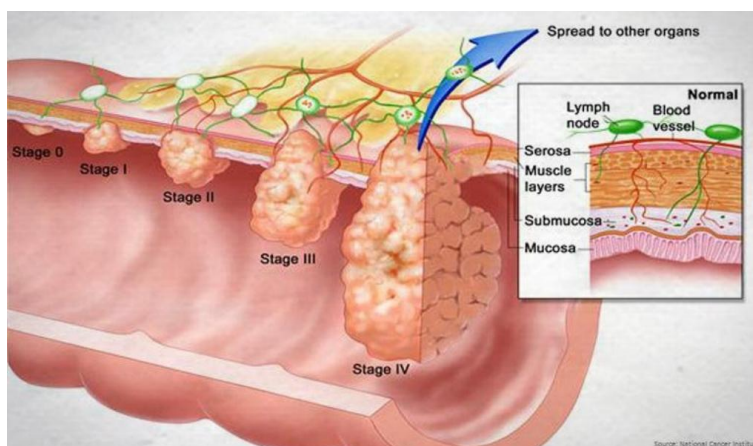
95% dos tumores colorretais são considerados esporádicos, ou seja, surgem em pessoas sem histórico familiar da doença, com as mutações genéticas envolvidas na carcinogênese ocorrendo em células somáticas. Os sintomas mais comuns na apresentação clínica do câncer colorretal são: dor abdominal, sangramento retal, alteração de hábito intestinal e perda de peso involuntária (MINISTERIO DA SAÚDE 2024).

No tratamento do câncer colorretal, a cirurgia para remoção do tumor primário, acompanhada de linfadenectomia regional, é a abordagem principal, assim como a remoção de metástases quando necessário. Para pacientes com estágios mais avançados da doença, a quimioterapia é indicada, sendo que em casos de estágio II ou III, a quimioterapia adjuvante é recomendada para prevenir recidivas, enquanto em estágios IV, a quimioterapia é usada para controle e alívio dos sintomas. A quimioterapia pode ser administrada antes da cirurgia (neoadjuvante) para melhorar a ressecabilidade do tumor, ou após a cirurgia (adjuvante) para reduzir o risco de metástases, como sugere o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas de adenocarcinoma de colon e reto 2024 do ministério da saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

A oxaliplatina continua sendo um dos principais quimioterápicos utilizados, frequentemente combinada com outros agentes, como o 5-fluorouracil, para maximizar os resultados do tratamento (DE JONG et. al. 2011). Em termos de prevenção, adotar uma dieta rica em fibras, controlar o peso e manter uma alimentação balanceada são medidas essenciais. Além disso, estudos sugerem que o uso prolongado de aspirina e antiinflamatórios não esteroidais pode reduzir a incidência de câncer colorretal (CAPPELL, 2008; JANKOWSKI; HUNT, 2008; COOPER *et al.*, 2010).

Entre os cinco subtipos de CCR (adenocarcinomas, tumores carcinóides, tumores estromais gastrointestinais, linfomas e sarcomas), os adenocarcinomas são os mais comuns (95% de todos os CCRs), podendo ser categorizado em três graus de diferenciação: adenocarcinoma bem diferenciado (grau I), moderadamente diferenciado (grau II) e pouco diferenciado (grau III). Atualmente, o estadiamento do CCR, referido como estadiamento clínico, é baseado em resultados de exames físicos, biópsias, exames de imagem (tomografia computadorizada ou ressonância magnética, raios X, Tomografia por Emissão de Pósitrons etc.) e achados cirúrgicos. Os critérios de estadiamento são baseados em: 1) até que ponto o câncer cresceu na parede do intestino; 2) se atingiu estruturas próximas; e 3) se espalhou para os nódulos linfáticos próximos ou para órgãos distantes (MINISTERIO DA SAÚDE, 2023).

ILUSTRAÇÃO 2: Estágio do câncer de colorretal.



Fonte: Nacional Câncer Institute, 2021.

Nas neoplasias, o crescimento celular é essencial, sendo a multiplicação das células crucial para o desenvolvimento e reposição celular. O tumor é composto por células tumorais (parênquima) e pelo estroma, que inclui vasos neoformados, células inflamatórias e tecido conjuntivo (DVORAK, 1986).

Os vasos neoformados que acompanham o crescimento tumoral são gerados pelo processo da angiogênese. A angiogênese envolve várias etapas, como vasodilatação, aumento da permeabilidade, migração de células endoteliais e maturação dos vasos, com o fator VEGF desempenhando papel central nesse processo (Hoeben *et al.*, 2004; Dvorak *et al.*, 1995). A angiogênese tumoral é uma etapa crítica no crescimento, disseminação metastática e recrescimento do câncer colorretal. A metástase do câncer colorretal pode resultar da entrada passiva na circulação secundária ao efeito de fatores angiogênicos. A angiogênese se tornou um alvo atraente para o desenvolvimento de medicamentos anticâncer, com base em seus papéis importantes no crescimento, invasão e metástase do tumor. Inibidores de angiogênese vêm sendo utilizados no tratamento de alguns cânceres, tendo como exemplo o bevacizumabe, um inibidor de VEGF. Alguns marcadores teciduais são utilizados para investigação do processo de angiogênese na progressão tumoral, dentre eles o próprio VEGF e o CD31, um marcador de células endoteliais (RMALI, *et al.*, 2007).

O comportamento do tumor é determinado pelas células parenquimatosas, mas sua evolução depende criticamente do estroma. A taxa de proliferação celular das

celulas neoplásicas parece ser determinante no prognóstico e desfecho nos tratamentos anti-câncer (Kumar *et al.*, 2005). O antígeno Ki-67 é expresso durante todo o ciclo celular em células em proliferação, exceto para células quiescentes (G0). A correlação entre a expressão de Ki-67 e o prognóstico de pacientes com CCR é contraditória em vários estudos, alguns apontando para um índice alto de Ki67 como mal prognóstico e outros apontando para um prognóstico melhor. O assunto foi revisado em uma metanálise em que a conclusão aponta que a alta expressão de Ki-67 está significativamente correlacionada com baixa sobrevida global e sobrevida livre de doença, indicando que a alta expressão de Ki-67 pode servir como um método preditivo valioso para mau prognóstico de pacientes com câncer colorretal. (ZHUO *et al.*, 2009).

As consequências das neoplasias estão relacionadas ao seu tamanho, localização e capacidade de produzir substâncias biologicamente ativas, além dos efeitos destrutivos no local original e em outras partes do corpo. O avanço científico tem sido essencial para melhorar o diagnóstico e o tratamento de tumores, com modelos experimentais desempenhando papel importante na compreensão do desenvolvimento do câncer e na avaliação de substâncias com potencial antineoplásico.

2.3 Tratamento farmacológico do câncer colorretal

A escolha do protocolo de tratamento do câncer colorretal deve considerar principalmente o perfil de toxicidade dos fármacos, as características fisiológicas, a capacidade funcional e as escolhas de cada paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

Terapia isolada ou uso de esquemas terapêuticos baseados na combinação de dois ou mais fármacos então entre as opções de tratamento do câncer colo retal. Os protocolos mais utilizados indicam o uso de leucovorin, 5-fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina. O protocolo quimioterápico sistêmico contendo 5-fluorouracil, leucovorin e oxaliplatina em infusão em bolus ou infusão contínua é conhecido como FOLFOX e o protocolo contendo leucovorin, irinotecano e 5-fluorouracil em infusão contínua ou em bolus é conhecido como FOLFIRI (ANDRE, T. *et al.*, 1999; BOLEN, L. T. *et al.*, 2016; DE GRAMONT, A. *et al.*, 2020). 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).

Novas terapias com associações estão sendo testadas em diversas combinações que além dos protocolos praticados outros como o ensaio FOXTROT é um estudo clínico importante na área de quimioterapia, especialmente no tratamento do câncer colorretal. O estudo FOXTROT investiga diferentes abordagens terapêuticas para o câncer colorretal em estágios iniciais. Este ensaio clínico teve como objetivo avaliar a eficácia da combinação de quimioterapia com oxaliplatina e fluorouracil (5-FU), com o adicional de terapias direcionadas, comparando diferentes esquemas de tratamento adjuvante (tratamento complementar após a cirurgia). A pesquisa envolveu pacientes com câncer colorretal em estágio II e III, e a principal meta era investigar se essas combinações de medicamentos poderiam melhorar as taxas de sobrevida e prevenir recidivas do câncer (ENG et al 2024).

O estudo FOXTROT é particularmente relevante, pois explorou o impacto da quimioterapia neoadjuvante (realizada antes da cirurgia), algo que ainda está sendo avaliado em termos de benefício clínico. Esse tipo de abordagem visa reduzir o tamanho do tumor antes da remoção cirúrgica, oferecendo uma oportunidade de melhorar os resultados da cirurgia.

Os resultados do ensaio FOXTROT têm ajudado a esclarecer as melhores práticas no uso de quimioterapia no tratamento de câncer colorretal e a explorar novas opções de terapias combinadas, com foco em tratamentos menos invasivos e mais eficazes. Além disso, o estudo também levantou questões sobre o uso de medicamentos direcionados (como os inibidores de EGFR ou VEGF) em combinação com quimioterapia tradicional a base de oxaliplatina, por exemplo, o que pode abrir caminho para tratamentos mais personalizados e com menos efeitos colaterais para os pacientes.

Apesar dos benefícios da quimioterapia, não se pode negligenciar o fato de que os fármacos empregados no tratamento do câncer colorretal desencadeiam diversos efeitos tóxicos no organismo das pessoas em tratamento (BRAUN. *et al.*, 2011). A oxaliplatina, um dos principais fármacos empregados nos diversos esquemas de quimioterapia adjuvante do câncer colorretal tem como principal a neurotoxicidade que será abordada adiante.

Por conta da alta frequência de reações tóxicas severas, modificações, variações e associações dos protocolos terapêuticos FOLFOX e FOLFIRI estão sendo utilizados

no tratamento do câncer colorretal, na tentativa de minimizar a incidência de desfechos negativos (CTCAE 2010).

2.4 Oxaliplatina

A oxaliplatina é um agente citotóxico/antineoplásico sintético que pertence à família dos sais de platina (TAÏB; DURAND; BRUNET, 2020), sendo um agente platino de terceira geração. A oxaliplatina 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, sendo frequentemente usada como primeira linha de tratamento do câncer colorretal metastático (KAGIAVA *et al.*, 2015; DILRUBA; KALAYDA, 2016) ou como terapia adjuvante do câncer colorretal, atualmente o câncer com segundo lugar em incidência e mortalidade, em ambos os sexo (PULVERS; MARX, 2017; SALAT, 2020, INCA 2020).

A introdução da oxaliplatina no esquema terapêutico do câncer colorretal aumentou a sobrevida substancial no estágio III e prolongando a sobrevida em pacientes no estágio IV (KARLSSON; ANDERSSON; JYNGE, 2017), Oxaliplatina é também usada 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 (PULVERS; MARX, 2017).

2.5 Mecanismos de ação da oxaliplatina.

O efeito antitumoral da oxaliplatina baseia-se em dois mecanismos principais, uma citotoxicidade direta em que o alvo é o DNA, onde ocorre a formação de aductos no DNA, havendo o bloqueio de sua duplicação e consequente apoptose celular (ILUSTRAÇÃO 3); o outro mecanismo depende da ativação de uma resposta imune direcionada, sendo caracterizada por ação antitumoral imunogênica (ILUSTRAÇÃO 4).

Após a exposição à oxaliplatina, algumas células tumorais, possivelmente, ao entrar 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 que é aumentada pela oxaliplatina. Nesse ponto, as células tumorais podem ser fagocitadas pelas células dendríticas que posteriormente apresentam antígenos tumorais aos linfócitos T que promovem a produção de interferon γ e também interagem com receptores toll like 4 (TLR4) na superfície das células dendríticas, funcionando como uma vacina contra o tumor.

O HMGB1 (proteína de alta mobilidade do grupo caixa 1) desempenha um papel crucial no mecanismo antitumoral, especialmente no contexto de tratamentos com quimioterápicos como a oxaliplatina. Quando as células tumorais são danificadas pela oxaliplatina, o HMGB1 é liberado do núcleo para o espaço extracelular, atuando como um sinal de dano celular. Essa liberação ativa o sistema imunológico, estimulando células como macrófagos e células dendríticas, que reconhecem o HMGB1 como um "alarme" de perigo (SALES et. al. 2023).

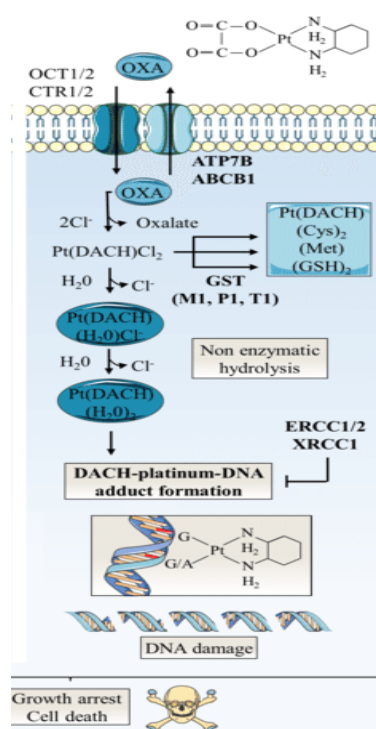
O HMGB1 interage com receptores como o TLR4, desencadeando uma resposta imune inflamatória que potencializa a eliminação das células tumorais. Esse mecanismo contribui significativamente para a eficácia antitumoral da oxaliplatina, tornando a resposta imunológica mais eficiente e promovendo a destruição de células cancerígenas. Assim, o HMGB1 não apenas media a resposta ao estresse celular, mas também é fundamental para fortalecer a imunidade antitumoral, ampliando os efeitos terapêuticos da quimioterapia (SALES et. Al. 2023).

A ativação de células imunes, assim como alterações e morte celular por necrose, pode secretar o HMGB1 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, pois que estes não desempenham papel importante na neuropatia causado por oxaliplatina (MAKKER *et*

al., 2017; TSUBOTA *et al.*, 2019; SEKIGUCHI, KAWABATA, 2020), o que sugere ser liberado pelas própria 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). Os mecanismos de ação supracitados estão ilustrados na ILUSTRAÇÃO 3 e 4.

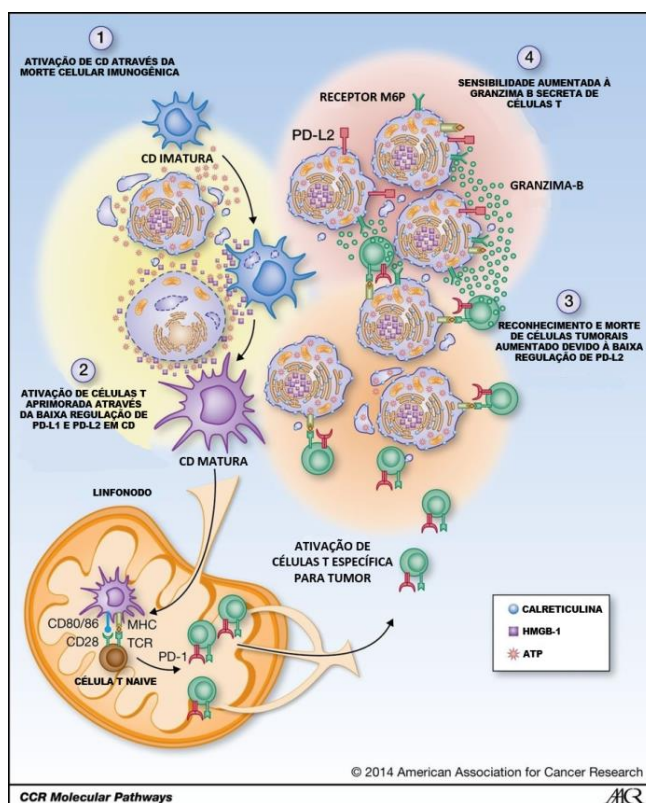
ILUSTRAÇÃO 3: Mecanismo de ação da oxaliplatina por citotoxicidade direta.



Fonte: Adaptada de Very *et al.* (2017). Representação esquemática do mecanismo de ação citotóxico da oxaliplatina. As linhas com ponta de seta indicam a conversão química do metabólito, enquanto as linhas com ponta de barra representam a inibição do processo químico. Oxaliplatina (OXA) é transportada principalmente por transportadores de cátions orgânicos (OCT1/2) e cobre (CTR1/2). Os transportadores de ATPase tipo P (ATP7A/B) e transportadores ABC promovem seu efluxo. Dentro da célula, o deslocamento do oxalato lábil e a hidrólise não enzimática promovem a conversão de OXA em metabólitos ativos, como platina monoaquo-1,2-diaminociclohexano (DACH) e platina diaquo-DACH. Esses produtos alquilam o DNA, levando a ligações cruzadas intra-fita G/G ou G/A que, se não forem reparadas, bloquearão a replicação e a transcrição do DNA, levando à apoptose. Os processos de

desintoxicação celular incluem metabólitos direcionados para excreção por conjugação de compostos aquosos com cisteína (Cys), metionina (Met) ou GSH. Em particular, a conjugação de GSH é catalisada por GST

ILUSTRAÇÃO 4 : Mecanismos de ação da oxaliplatina por morte celular imunogênica .



Fonte: adaptada de Hato *et al.* (2014). A ilustração representa o mecanismo de ação de morte celular imunogênica da oxaliplatina. Efeitos imunológicos de quimioterápicos de platina no microambiente tumoral. Os medicamentos de platina afetam o microambiente tumoral de várias maneiras: (1) A liberação de ATP de células que morrem devido à exposição à platina atrai DCs, que ocupam partes de células que estão morrendo e que têm expressão de calreticulina na superfície celular. O ATP extracelular, junto com HMGB-1, leva à maturação de DC e à regulação positiva de moléculas coestimulatórias e à apresentação de peptídeos específicos do tumor na classe I do MHC. (2) A maturação de DCs na presença de medicamentos de platina resulta na regulação negativa de PD-L1 e PD-L2 nas DCs, aumentando seu potencial de ativação de células T. As DCs maduras migram para o linfonodo, onde preparam células T ingênuas e específicas do tumor para células T citotóxicas efetoras, que migram para o microambiente tumoral. (3) Os medicamentos de platina inativam o STAT6 nas células tumorais, levando à diminuição da expressão de PD-L2, resultando em maior reconhecimento e morte pelas células T específicas do tumor. (4) A platina induz a regulação positiva do receptor M6P nas células tumorais, o que leva à lise aumentada das células tumorais pela granzima-B secretada pelas células T ativadas. A expressão aumentada do receptor M6P também induz a lise de células cancerosas que não estão em contato direto com as células T específicas do tumor.

2.6 Toxicidade e efeitos adversos da oxaliplatina

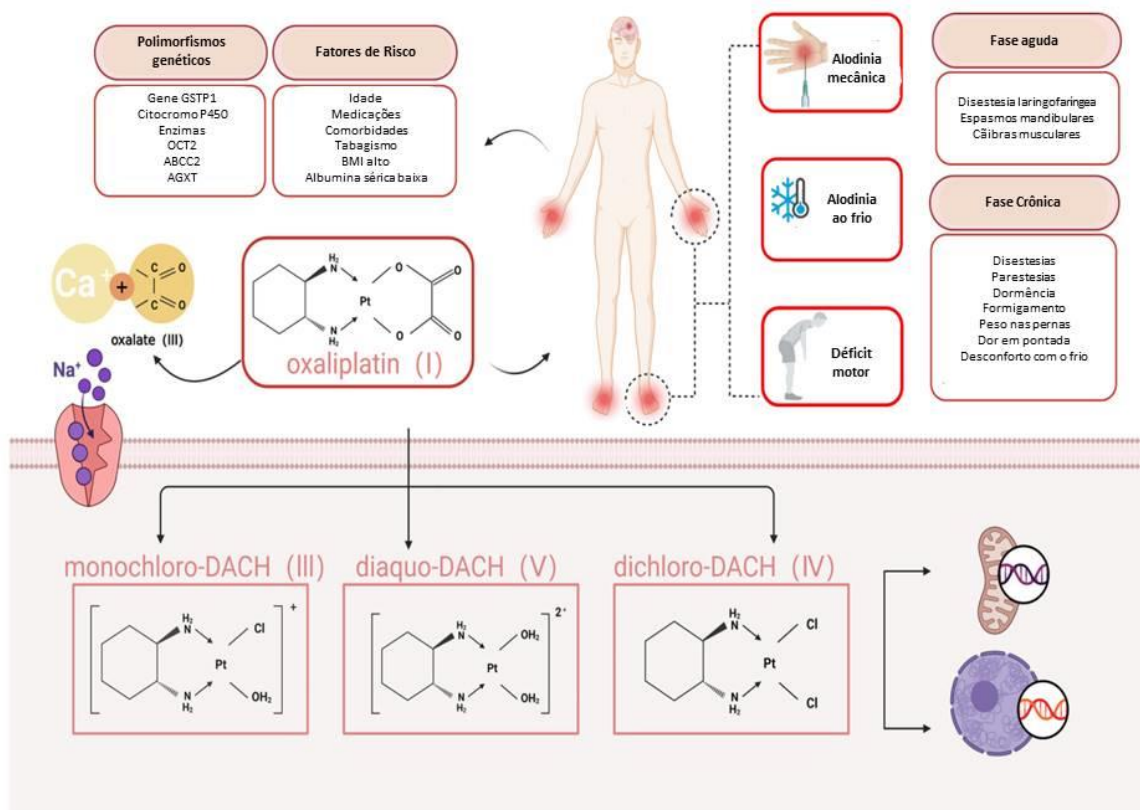
A oxaliplatina tem um melhor perfil de segurança quando comparado aos agentes platinos, sendo caracterizada por apresentar uma baixa a moderada hematotoxicidade e menor toxicidade renal (ALCINDOR; BEAUGER, 2011; NAGASHIMA *et al.*, 2014). Entretanto, dentre os efeitos tóxicos mais comuns durante o tratamento estão a mielossupressão, náuseas, vômitos, nefrotoxicidade e

neurotoxicidade (RAYMOND *et al.*, 1998). Essa neurotoxicidade (NAGASHIMA; *et al.*, 2014; LOPRINZI, *et al.*, 2014) provoca um quadro de NSP (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 quanto à terapêutica (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017).

A NSP associada ao uso de oxaliplatina se manifesta de duas diferentes formas, uma forma aguda e uma fase crônica e cumulativa. A manifestação aguda se caracteriza por parestesias e disestesias evidentes nas mãos, pés, e região perioral, tensão nas mandíbulas espasmos e tremores relacionados ao frio, que afeta a maioria dos pacientes de forma transitória, não persistindo por mais de 7 dias após a administração da oxaliplatina. Outros sintomas incluídos na forma aguda são as disestesias faringolaringeas, espasmos na mandíbula e câimbras musculares que, às vezes se apresentam como rigidez nas mãos ou pés ou incapacidade de segurar objetos, similar a neuromiotonia (GROTNEY *et al.*, 2011).

A manifestação crônica se caracteriza por sintomas como dormência e formigamento que afetam as mãos e pés além de dor em picada, desconforto ao frio, peso nas pernas, dor nos maxilares (GROTNEY *et al.*, 2011; GODINHO *et al.*, 2020).
(ILUSTRAÇÃO 5)

ILUSTRAÇÃO 5: Manifestação da NPS por Oxaliplatina.



Fonte: CHENG et al, 2023.

Normalmente, os sintomas agudos são solucionados em até uma semana, porém com a progressão de doses cumulativas, a neuropatia crônica pode desenvolver-se em 20 a 50% dos pacientes (PARK *et al.*, 2011). Embora cumulativa, é, na maioria das vezes, reversível (GROTNEY *et al.*, 2011). Ao término da quimioterapia, a forma crônica torna-se evidente e muitas vezes persistente na maioria dos pacientes entre 4 a 6 meses e pode desaparecer em aproximadamente 40% dos pacientes após 6 a 8 meses (BRIENZA *et al.*, 1995 apud WILSON *et al.*, 2002).

Além da neurotoxicidade sensorial, há relatos também de neurotoxicidade motora que é caracterizada por espasmos tetânicos, miotonia, câimbras, tensão muscular prolongada, fasciculações musculares, afetando pernas, coxas, mãos e maxilar, prejudicando os movimentos (GROLLEAU *et al.*, 2001).

Um estudo publicado por Cheng *et al.* 2023, investigaram os efeitos neurotóxicos da oxaliplatina, destacando sua capacidade de causar apoptose nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG). Embora a oxaliplatina induza danos ao

DNA em neurônios sensoriais, ela tem um impacto menor na formação de adutos de platina-DNA em comparação à cisplatina, resultando em menos efeitos neurotóxicos. No entanto, os danos causados por oxaliplatina comprometem a função dos neurônios através de vários mecanismos, incluindo a disfunção dos canais iônicos dependentes de voltagem, neuroinflamação, estresse oxidativo, e a disfunção mitocondrial, culminando em apoptose. O dano ao DNA nos neurônios sensoriais, particularmente na via de reparo por excisão de base, é um fator importante no agravamento dessa neurotoxicidade.

A oxaliplatina também foi associada a uma maior sensibilidade ao frio em neurônios sensoriais, por meio da regulação da transcrição de canais iônicos, como os canais de sódio (Na^+) e potássio (K^+), que alteram a resposta dos neurônios ao estímulo térmico. Essa descoberta sugere que estratégias de prevenção da neuropatia induzida por oxaliplatina (OIPN) devem focar na proteção e regulação desses canais iônicos para reduzir a sensibilidade ao frio e melhorar o bem-estar dos pacientes. Além disso, a OIPN está ligada ao aumento das respostas inflamatórias, particularmente em DRGs e nervos periféricos, com ativação da via de NLRP3 e liberação de IL-18, que contribuem significativamente para o desenvolvimento da neuropatia (LIN *et al.* 2022).

Os transportadores também desempenham um papel crucial na dinâmica da oxaliplatina, regulando sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção nos neurônios. Transportadores como o OCT2, OCTN, CTR1 e MRP2 são fundamentais para a captação e o efluxo do medicamento, e sua função alterada pode afetar tanto a eficácia terapêutica quanto os eventos adversos, como a OIPN. O estresse oxidativo, mediador central de várias condições celulares patológicas, é um mecanismo vital para a OIPN. Esse estresse pode ser induzido diretamente pela formação de adutos de DNA ou indiretamente pela disfunção mitocondrial na cadeia de transporte de elétrons, um processo que é crucial para a neurotoxicidade observada (ARETI *et al.*, 2014).

Além disso, a disfunção mitocondrial, outro fator chave na OIPN, ocorre devido à formação de adutos de platina-DNA pela oxaliplatina. Isso resulta em inibição da síntese de DNA e disfunção nas funções celulares mitocondriais, exacerbando o estresse oxidativo e comprometendo a viabilidade dos neurônios. A compreensão desses mecanismos ajuda a aprimorar o tratamento da neuropatia associada à oxaliplatina, sugerindo caminhos para futuras estratégias terapêuticas que visem minimizar os efeitos adversos dessa importante quimioterapia (ZHENG *et al.*, 2011).

A neurotoxicidade causada pela oxaliplatina acomete predominantemente os

neurônios sensoriais, células satélites e células gliais do gânglio da raiz dorsal, bem como células neuronais, gliais e células de Schwann da medula espinhal (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

Peng (2022) relata em seu estudo sistemático alguns estudos pré-clínicos sobre prevenção de neuropatia da oxaliplatina, mostrando a eficácia de uma ampla gama de intervenções potenciais, desde medicamentos neuroativos como gabapentina e antioxidantes como glutathione, até medicamentos fitoterápicos. No entanto, as tentativas de transferir os resultados encorajadores de estudos em animais para humanos tiveram sucesso limitado.

Embora muitos ensaios clínicos tenham tentado identificar intervenções que possam prevenir a NSP induzida por oxaliplatina em humanos, o pequeno tamanho da amostra na maioria desses ensaios e a falta de métricas de mensuração padronizadas tornaram os resultados difíceis de interpretar. De fato, as últimas diretrizes de oncologia sobre neuropatia periférica induzida por quimioterapia reconhecem que, apesar da infinidade de ensaios disponíveis, não há evidências convincentes de que haja qualquer intervenção que possa prevenir efetivamente a neuropatia (CHENG *et al.*, 2023).

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 duloxetine pode ser usada como tratamento dos sintomas dessa neuropatia (SMITH *et al.*, 2013; HERSHMAN *et al.*, 2014; LOPRINZI *et al.*, 2020).

Diante dessa lacuna terapêutica, a pesquisa de alternativas, especialmente no campo dos produtos naturais, tem ganhado relevância. Um exemplo promissor é a *Morinda citrifolia* L, conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras. Novos estudos investigando essa planta podem oferecer perspectivas inovadoras no manejo da neuropatia induzida pela oxaliplatina, proporcionando um tratamento mais seguro e acessível para os pacientes. Essas pesquisas são essenciais para o avanço do tratamento dessa condição debilitante e podem representar um grande passo na melhoria da qualidade de vida dos pacientes oncológicos.

2.7 *Morinda citrifolia* L.

Morinda citrifolia L. (Noni), membro da família Rubiaceae, é uma pequena

árvore ou arbusto perene (ILUSTRAÇÃO 6). É nativa das regiões do Sudeste Asiático até a Austrália e atualmente tem distribuição pantropical (WANG *et al.*, 2002; BUI *et al.*, 2006).

É comumente conhecida como noni com outros nomes comuns. *M. citrifolia* tem sido tradicionalmente usada para tratar diversas doenças onde praticamente todas as partes da planta podem ser aplicadas por via tópica ou consumidas por via oral na forma de chás ou bebidas fermentadas.

Algumas das alegações terapêuticas tradicionais relatadas são para aliviar dor de garganta, carbúnculo, descamação ou rachaduras nos pés, tratamento de úlcera estomacal, hipertensão arterial, esplenomegalia, náusea, cólica e febre, diabetes, doenças hepática, hemorragias e tosse.

Em estudos farmacológicos a , *Morinda citrifolia* L mostrou atividade anticâncer para várias linhagens celulares, como células de câncer de pulmão, colo do útero e mama. Estudos recentes também mostraram que *M. citrifolia* possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antiangiogênicas, antidislipidêmicas, hipoglicêmica, hepatoprotetora e propriedades imunomoduladoras (KUMAR, H. C. *et al.*, 2022)

ILUSTRAÇÃO 6: Fruto e Árvore da *Morinda citrifolia* L



Fonte: EMBRAPA, 2024.

2.8 Proteína de Transferência Lipídica isolada das sementes de *Morinda citrifolia* - *McLTP1*

As proteínas de transferência lipídica (LTPs) são proteínas isoladas de várias fontes vegetais que se mostraram capazes de se ligar a lipídios e pertencem às classes mais funcionalmente importantes de proteínas vegetais que se ligam e transferem lipídios (FINKINA *et al.*, 2016). As LTPs são subdivididos e compreendem duas famílias, baseada nas suas massas moleculares que varia de 7 a 10 kDa (CARVALHO; GOMES, 2007; FINKINA *et al.*, 2016) tamanho molecular (SALMINEN; BLOMQUIST; EDQVIST, 2016) ou com base no comprimento do polipeptídeo da proteína madura (EDSTAM *et al.*, 2011). E são divididas em Proteínas de Transferência Lipídica tipo ou família 1 (LTP1) e as Proteínas de Transferência Lipídica tipo ou família 2 (LTP2) (CARVALHO; GOMES, 2007; EDSTAM *et al.*, 2011; SALMINEN; BLOMQUIST; EDQVIST, 2016).

A *McLTP1* é uma proteína de transferência lipídica vegetal, obtida a partir das sementes de *Morinda citrifolia*, 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), 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/farmacológicas, mesmo após três meses de armazenamento sob refrigeração e proteção da luz (COSTA, 2016). Além disso apresentou atividades inibitórias de tripsina em diferentes pHs e temperaturas, bem como da quimiotripsina, papaína e alfa-amilase (LUFIT, 2015).

Em estudos pré-clínicos *in vitro* das propriedades espectroscópicas da *McLTP1* em interação com micelas, na perspectiva de compreender a interação com as membranas biológicas pois esta interação com lipídeos, 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) o que explica uma boa atividade de transferência lipídica em lipídeos aniônicos nas membranas biológicas.

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 em espécies de bactérias 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 (SOUSA, 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 pré-clínicos *in vivo* de toxicidade, a *McLTP1* demonstrou não provocar mortalidade, nem alterações alergênicas, comportamentais, hematológicas e bioquímicas em camundongos (COSTA, 2021).

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) apresentando continuidade da atividade 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 antagonistas e bloqueadores/inibidores (L-NAME, glibenclamida, capsazepina) reverteram significativamente o efeito antinociceptivo da *McLTP1* (COSTA, *et al.*, 2021).

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 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 modos e força de ação similares em ambas às vias de administração oral e intraperitoneal (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. E a ação hepatoprotetora, que por sua vez, mostrou reduzir as alterações histopatológicas 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 indução por administração de gentamicina, no qual foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de creatinina, proteinúria e nos níveis séricos de ureia (SILVERIO *et al.*, 2020)

A *McLTP1* também apresentou efeito protetor em um modelo de sepse induzida por Ligadura e punção cecal (LPC) em camundongos (SOUZA *et al.*, 2018). 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).

O efeito da *McLTP1*, administrada diariamente na dose de 4 mg/kg (0,4mg/ml), foi recentemente avaliado em um modelo murino de NSP por oxaliplatina. Nesse modelo experimental que mimetiza a condição clínica experimentada pelos pacientes em curso de quimioterapia por oxaliplatina, a *McLTP1* mostrou um efeito antinociceptivo e preventivo sobre a neuropatia. Além disso mostrou um potencial significativo de prevenir a redução do número total de leucócitos e da contagem diferencial para linfócitos provocada pela oxaliplatina (CESÁRIO, 2023).

Sabendo-se que a oxaliplatina, exerce seu efeito antitumoral tanto pela indução de apoptose por citotoxicidade direta assim como também pela apoptose imunogênica, esse efeito da *McLTP1* sobre a leucopenia induzida por oxaliplatina pode ser interessante do ponto de vista do efeito antitumoral. Como a oxaliplatina causa queda do número de linfócitos, e ao mesmo tempo precisa deles para exercer seu efeito antitumoral de forma sinérgica pela ação imunogênica, aumentar ou manter esses linfócitos através da administração da *McLTP1*, pode promover aumento dessa morte celular imunogênica, potencializando ainda mais a ação antitumoral da oxaliplatina, além de promover o efeito antinociceptivo e neuroprotetor contra a NSP provocada pela oxaliplatina.

Trazendo para a realidade clínica, a administração da *McLTP1* de forma concomitante aos ciclos de quimioterapia que possuem oxaliplatina na sua composição,

poderia ser avaliado no sentido de promover prevenção ou redução do efeito neurotóxicos além de possivelmente potencializar o efeito antitumoral da oxaliplatina.

Diante do grande potencial terapêutico da *McLTP1*, na NSP induzida por oxaliplatina (dados ainda não publicados) e da necessidade incluir novas estratégias farmacológicas que não interfiram no efeito antitumoral, mas que potencializem esse efeito, faz-se necessário estudar a participação desta proteína (*McLTP1*) na interferência do mecanismo antitumoral desse antineoplásico.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer colorretal é um dos tipos de câncer mais prevalentes no mundo, e seu aumento contínuo tem se tornado uma preocupação crescente. A incidência da doença tem registrado um crescimento significativo, refletindo mudanças nos padrões de vida, como dietas pouco saudáveis e o envelhecimento populacional, além de um maior acesso a exames de diagnóstico.

O tratamento do câncer colorretal tem evoluído ao longo dos anos, atualmente com novas abordagens farmacológicas como a imunoterapia e inibidores de checkpoint, mas a oxaliplatina ainda continua como agente antineoplásico de primeira escolha principalmente para câncer colorretal metastático. Uma quimioterapia eficaz no tratamento de casos em estágio avançado, proporcionando uma importante opção terapêutica para aumentar as taxas de sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes (INCA, 2023).

A oxaliplatina tem a vantagem de apresentar menos efeitos tóxicos em relação a outros compostos de platina. Contudo, a toxicidade neurológica é uma desvantagem, pois pode causar neuropatia sensitiva periférica, que, dependendo da gravidade, exige a redução ou suspensão da dosagem, limitando o tratamento e até as chances de sobrevivência do paciente. Esse efeito colateral afeta significativamente a qualidade de vida, impactando fisicamente e gerando consequências sociais e econômicas.

Em relação à terapêutica da NSP por oxaliplatina, vários alvos moleculares foram propostos, mas nenhum foi capaz de causar grande impacto no tratamento dessa problemática. Na prática clínica, o que se tem observado é que os tratamentos utilizados na tentativa de combater a neuropatia causada por OXL, como antidepressivos, anticonvulsivantes, opioides, vitamina E, entre outros, têm tido pouco sucesso e efeito apenas paliativo. Atualmente, o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do

Câncer (LAFICA) dedica seus estudos no entendimento da fisiopatologia NSP (AZEVEDO *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.* 2020; GODINHO *et al.* 2020; CESÁRIO *et al.* 2023).

Recentemente estudos realizados pelo LAFICA tem mostrado que a *McLTP₁* previne e reduz o efeito neurotóxico (NSP) da oxaliplatina em modelo experimental e que também diminui a leucopenia associada ao uso desse quimioterápico no mesmo modelo. Estudos de outros autores também apontam para um potencial efeito citotóxico em células cancerígenas, demonstrado *in vitro* e efeitos antinociceptivo e anti-inflamatórios em modelos experimentais, destacam-se sua possível ação opioide e a modulação do canal TRPV1(CESÁRIO, 2023).

Dessa forma, se fez necessário um estudo que avalie ao mesmo tempo o efeito preventivo da *McLTP₁* sobre a NSP e a possível interferência sobre o efeito antitumoral da oxaliplatina. A relevância desse estudo apoia-se no fato que um tratamento para a condição neuropática associada ao uso de oxaliplatina não pode interferir com seu efeito antitumoral. Portanto, a prevenção/tratamento da NSP com *McLTP₁* idealmente não deve interferir com o propósito farmacológico da quimioterapia e, se interferir, que seja em um nível de potenciação do efeito antitumoral do quimioterápico. A não avaliação dessa condição inviabiliza um estudo clínico nesse sentido.

Diante disso, surge as possíveis perguntas que serviram como ponto de partida do estudo: Seria a *McLTP₁* capaz de modificar ou modular o efeito antitumoral da oxaliplatina em camundongos com tumor de células CT26.WT? Teria a *McLTP₁* um efeito nulo ou potencializador sobre o efeito antitumoral da oxaliplatina na mesma dose em que inibe o desenvolvimento da NSP? A *McLTP₁* previne a leucopenia induzida por oxaliplatina em camundongos com tumor de células CT26.WT? Teria a proteína *McLTP₁* um efeito citotóxico direto em células CT26.WT ou um efeito amplificador sobre a citotoxicidade da oxaliplatina?

Para responder essas perguntas, faz-se necessário estudar e avaliar o efeito da *McLTP₁* sobre a neuropatia induzida por oxaliplatina em animais com tumor de células de câncer colorretal, uma vez que não foram encontrados estudos que avaliem essa proteína nessa condição clínica em modelos experimentais de tumor colorretal *in vivo*, o que faz deste estudo uma contribuição inédita para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o manejo da neuropatia periférica induzida por oxaliplatina no tratamento do câncer colorretal.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito da combinação terapêutica da proteína *McLTP₁* e oxaliplatina na atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* e na neuropatia sensitiva periférica em camundongos com tumor de células de adenocarcinoma colorretal.

4.2 Específicos:

- Avaliar o efeito citotóxico, *in vitro*, da *McLTP₁*, oxaliplatina e da combinação de ambas em células CT26.WT em diversos tempos 48, 72 e 96 horas.
- Determinar a dose e protocolo de administração de oxaliplatina que tenha efeito antitumoral e indutor de NPS ao mesmo tempo em camundongos com tumor de células CT26.WT.
- Avaliar o efeito da *McLTP₁* sobre a alodinia mecânica e térmica induzida por oxaliplatina em camundongos com tumor de células CT26.WT
- Avaliar o efeito da *McLTP₁*, oxaliplatina e da combinação de ambas no crescimento tumoral de camundongos com tumor de células CT26.WT;
- Avaliar a expressão de Ki67, CD31, HMGB1, em tecido tumoral de animais tratados com *McLTP₁*, oxaliplatina e a combinação de ambas.
- Investigar o efeito da *McLTP₁* sobre a leucometria total e diferencial em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com oxaliplatina;

5. MATERIAIS E METODOS

5.1 Células CT26.WT

Foram utilizadas nesta pesquisa células CT26, que é uma linhagem celular indiferenciada de carcinoma de cólon induzida por N-nitroso-N-metiluretano (NNMU), em camundongos da linhagem BALB/c, clonadas para gerar a linha celular designada CT26.WT, aplicada especificamente para protocolo de imunoterapia e em estudos sobre a resposta imune do hospedeiro. Tais células foram obtidas do centro global de recursos biológicos, American Type Culture Collection – ATCC, principal desenvolvedor e

fornecedor de linhas de células e microrganismos autenticados (Certificado de qualidade ATCC - ANEXO II).

5.2 Ensaio de citotoxicidade, *in vitro*, em células CT26.WT: Curva concentração resposta da Oxaliplatina e *McLTP*₁.

Para a avaliação do efeito citotóxico *McLTP*₁ e OXL e cálculo das respectivas IC₅₀, células CT26.WT foram plaqueadas em placas de cultivo de 96 poços em uma concentração de 1×10^4 células/mL e após 24 horas foram incubadas com concentrações decrescentes de *McLTP*₁ (200 a 0,02 μ M), OXL (25 a 0,39 μ M) ou o veículo (etanol) e mantidas por 48, 72 e 96h em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Após seus respectivos horários foi realizado o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular. Os tratamentos foram feitos em triplicata e o experimento foi feito duas vezes. Para efeito visual, as células foram fotografadas dentro do poço (1 foto representativa da triplicata) em microscópio invertido (Nikon eclipse) com objetiva com aumento de 40x.

5.3 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células CT26.WT: avaliação da combinação de *McLTP*₁ com concentrações crescentes de oxaliplatina

Para a avaliação do efeito citotóxico da combinação da *McLTP*₁ com a OXL e cálculo das respectivas IC₅₀, células CT26.WT foram plaqueadas em placas de cultivo de 96 poços em uma concentração de 1×10^4 células/mL e após 24 horas foram incubadas com *McLTP*₁ (25 e 0,39 μ M) em combinação com concentrações crescentes de OXL (25 a 0,39 μ M) e mantidas por 48,72 E 96h em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Após seus respectivos horários foi realizado o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular. Os tratamentos foram feitos em triplicata e o experimento foi feito duas vezes. Para efeito visual, as células foram fotografadas dentro do poço (1 foto representativa da triplicata) em microscópio invertido (Nikon Eclipse) com objetiva com aumento de 40x

5.4 Ensaio MTT

O teste de citotoxicidade visa avaliar os efeitos tóxicos de uma substância a nível celular, tanto em termos letais quanto subletais. Neste estudo, foi utilizado o método direto de citotoxicidade com MTT, que permite avaliar a função mitocondrial de maneira quantitativa. Esse método baseia-se na redução do composto MTT (3-(4,5-

dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio brometo; Sigma), que se converte em cristais de formazana. A reação de redução ocorre nas mitocôndrias, catalisada pela enzima succinato-desidrogenase, e a quantidade de formazana gerada está diretamente relacionada à capacidade de redução do MTT, refletindo a atividade mitocondrial.

Para a realização desse teste, após os períodos de incubação com os tratamentos, adicionou-se 20 µl por poço de MTT (Sigma Aldrich) diluído com PBS em uma concentração de 5 mg/ml. O MTT foi incubado por 3 horas a uma temperatura de 37 °C e 5 % de CO₂. Após esse período, foi removido todo o conteúdo dos poços e adicionado 100 µl de DMSO em cada poço sob agitação de 5 min para solubilizar os cristais de formazana. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Biotek) no comprimento de onda de 590 nm (HIROMOTO; YAMAZAKI, 2017).

5.5 Animais e Aspectos éticos

Os experimentos conduzidos nesta pesquisa seguiram todos os regulamentos éticos em pesquisa animal estabelecidos na lei N° 11.794/2008, 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 n° 20090522-0. Todos os protocolos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Universidade Federal do Ceará (UFC).

Foram utilizados 91 camundongos machos, adultos da espécie/ linhagem BALB/c “Specific Pathogen Free” (SPF), com massa corporal entre 20 a 25 gramas (g), provenientes do biotério do NPDM, UFC. Os animais foram acomodados em microisoladores com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e livre acesso à ração padrão e água potável em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos experimentais (n=7) conforme o tratamento recebido, sendo o tamanho da amostra determinado como PEREIRA *et al.* (2018).

Os animais foram submetidos à indução de neuropatia sensitiva periférica, inoculação de células CT26.WT e tratamento com oxaliplatina e *MclTP*₁. Durante o período do estudo, foram avaliados diariamente por meio de observação clínica e pela

escala de Grimace para camundongos.

Os parâmetros analisados incluíram trofismo muscular, lesão e aspecto dos pelos e olhos, alterações no sistema nervoso central (consciência, atividade e coordenação motora, reflexos e outros aspectos), foram monitorados quanto à massa corpórea e sinais de infecção local ou generalizada, marcha, alterações posturais e comportamentais (SOTOCINA, *et al.*, 2011). Foi considerado para critério de exclusão os animais que não desenvolveram o tumor palpável de células CT26.WT e animais que obtiveram distúrbios clínicos já descritos. Todos os esforços necessários foram realizados para minimizar ou reduzir a dor, o sofrimento e o estresse dos animais.

5.6 Preparo das células CT26WT para inoculação em camundongos

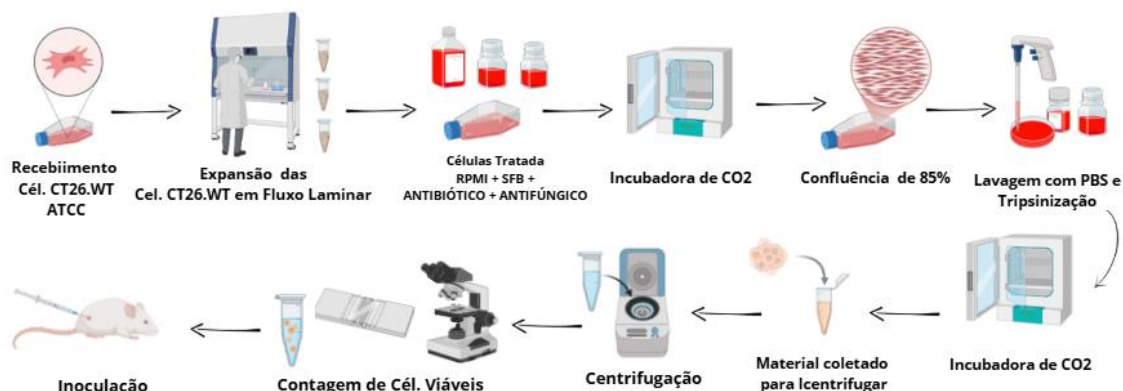
As células CT26.WT, foram cultivadas em frascos plásticos de 75 cm² com meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), devido não conter proteínas, lipídios ou fatores de crescimento, e complementada com solução antibiótica e antimicótica na diluição 1:100 a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Quando as células atingiram a confluência aproximada de 85%, o meio de cultivo foi removido e estas lavadas com PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH7,4) e incubadas com tripsina-EDTA (0,25 %) a 37 °C por no máximo 5 minutos, até liberação total das células do assoalho do frasco, o que foi determinado por meio de visualização em microscópio.

A ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio de cultura enriquecido com FBS, a suspensão de células foi transferida para um tubo falcon estéril de 15 ml (Kasvi, Brasil) e centrifugada a uma temperatura de 20 °C, a uma rotação por minuto (RPM) de 1.500 durante 5 minutos.

Após centrifugação, os sobrenadantes foram removidos e os pellets ressuspensos em 1 ml de meio de cultura contendo 10 % de SFB, as células foram contadas (para verificação do número de células desejado para inoculação) e analisadas (verificação de viabilidade celular) com auxílio de uma câmara de Neubauer, e em seguida preparadas na concentração necessária $0,25 \times 10^5$, quantidade necessária de células por 28 animal, para a inoculação na região dorsal do camundongo BALB/c, na ILUSTRAÇÃO 7, podemos observar o fluxo do cultivo celular das células CT26.WT.

ILUSTRAÇÃO 7: Fluxo do cultivo celular das células CT26.WT.



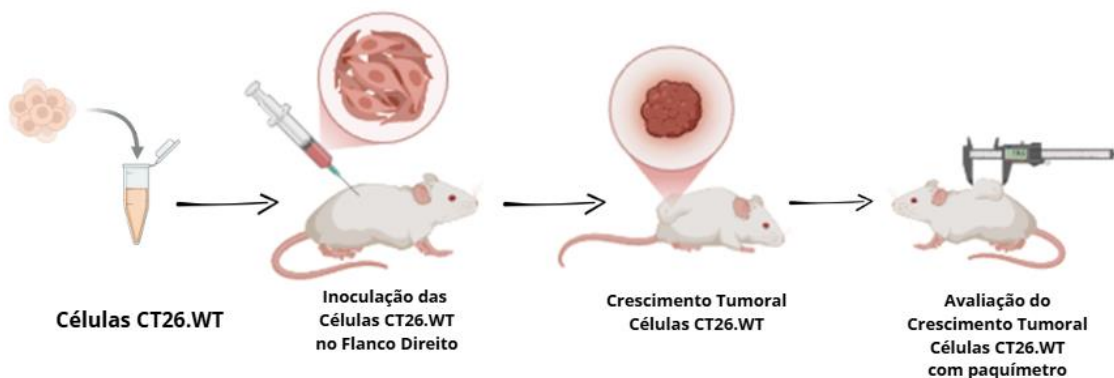
Fonte: Autor, 2024.

5.7 Inoculação das células e avaliação do crescimento tumoral.

Para a implantação do tumor, os camundongos foram tricotomizados, um dia antes e inoculados, no dorso, por via subcutânea a linhagem celular carcinoma de cólon murino CT26.WT, em uma concentração de $0,25 \times 10^5$ em um volume de 50 μl no primeiro experientto (com duração de 7 dias) e em um volume de 100 μl no segundo experimento (com duraçõa de 14 dias. Após a inoculação, os animais foram monitorados diariamente para identificar o aparecimento da massa tumoral inicial que se estabeleceu entre o 10º e 12º dia após a inoculação. Os tratamentos foram iniciados no primeiro dia de detecção da massa tumoral. O crescimento tumoral foi avaliado todos os dias da semana, utilizando um paquímetro até 14 dias de tratamento.

As dimensões tumorais foram medidas em duas dimensões (comprimento e largura) utilizando um paquímetro digital e o volume foi calculado de acordo com a fórmula: tamanho do tumor (mm^3) = (comprimento x largura 2) x 0,5.

ILUSTRAÇÃO 8: Inoculação das células CT26.WT. e avaliação do crescimento tumoral



Fonte: Autor, 2024.

5.8 Protocolo de preparo e administração de oxaliplatina

A oxaliplatina (Eloxatin®, 5mg/ml, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foi diluída em solução glicosada estéril a 5% e administrada na dose de 6 mg/kg, por via endovenosa, a cada 48 horas, durante 14 dias, 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 em um volume de 0,1 ml/10g de peso corporal. O grupo controle recebeu apenas as injeções de solução de glicose estéril 5% (5 ml/kg, veiculo da oxaliplatina), seguindo o mesmo protocolo experimental do grupo que recebeu oxaliplatina.

5.9 Extração, purificação e obtenção da proteína *McLTP*₁

Os frutos de noni (*M. citrifolia* L. var. *citrifolia*) foram colhidos no estágio de maturação amarelo claro de plantas localizadas em Fortaleza, Ceará, Brasil (3°44'24,1" S 38°34'36,2" W). Uma amostra exsiccata do material coletado está disponível para inspeção no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, catalogada sob o n°. 44.566. O acesso ao patrimônio genético está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados – SISGEN – sob o número A174C2B.

Para obtenção das sementes, os frutos foram lavados com água corrente e mantidos em recipiente na temperatura de 25°C por 3-4 dias até que atingissem o estágio translúcido-acinzentado.

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.

As sementes foram trituradas 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 Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas de acordo com a metodologia descrita por Campos *et al.* (2016) com as modificações introduzidas por Souza (2016), conforme descrito pelo Laboratório de Farmacologia e Bioquímica na padronização a seguir:

As proteínas foram extraídas da farinha delipidada das sementes de Noni (15g) 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, ressuspensionado 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 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.

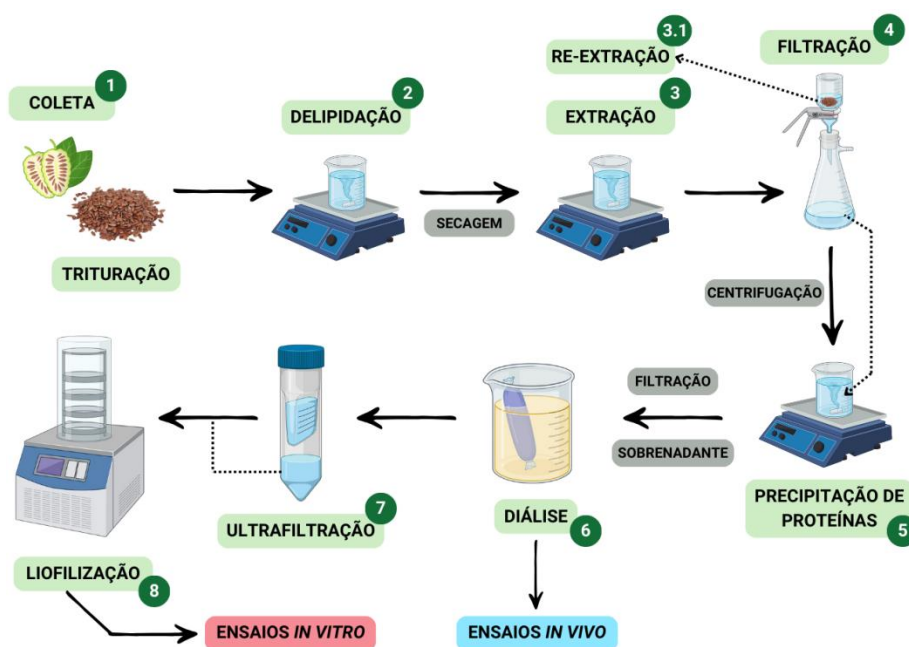
Amostras da fração solúvel em TCA 2,5 % foram submetidas à ultrafiltração (Vivaspin[®]/cut off 30 kDa) a 8.000 x g (30 minutos, 4 °C), sendo liofilizadas para análise de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970) e para os ensaios biológicos.

A fração da proteína liofilizada (4mg) foi dissolvida em Tris-HCl 0,05M/NaCl 0,15M, pH 8,5 e aplicada sobre uma coluna Sephadex G-50 (1,5 x 40cm) previamente

equilibrada com o mesmo tampão, onde as frações (2 ml) dos picos de proteínas foram monitorizadas a 280 nm e colhidas a um fluxo constante de 30 ml/h. Dois picos de proteína foram recuperados onde apenas a fração que exibiu atividade antinociceptiva (pico 2) conforme os estudos de Campos e colaboradores (2016) foi selecionada, concentrada, filtrada em gel e submetida a análise em Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (RP-HPLC) utilizando uma coluna C18 (coluna Agilent Eclipse XBD-C18 (250 x 4,6mm, 5µm)).

Através da análise cromatográfica obteve-se um pico bem definido da porção superior do pico 2. Para isso, a proteína foi então, dissolvida em água ultrapura para obter uma solução de 0,5mg/ml, filtrada através de uma membrana de 0,22µm e injetada em um volume de 20µl no HPLC. A coluna foi equilibrada com ácido acético aquoso a 0,02% e a proteína foi eluída a uma taxa de fluxo de 1 ml/min sob modo isocrático. A eluição foi monitorizada a 216nm através de um detector de matriz de díodos (Alliance HPLC System, Waters, Corp., Milford, MA) com pico de 7,9 minutos, e em seguida foi seco a vácuo e dissolvido em água ultrapura para ser utilizada nos testes.

ILUSTRAÇÃO 9: Fluxograma da Purificação da *McLTP*₁ (4mg/kg).



Autor: SOUZA, 2016, COSTA 2016.

5.10 Protocolos experimentais, grupos e desenho de estudo.

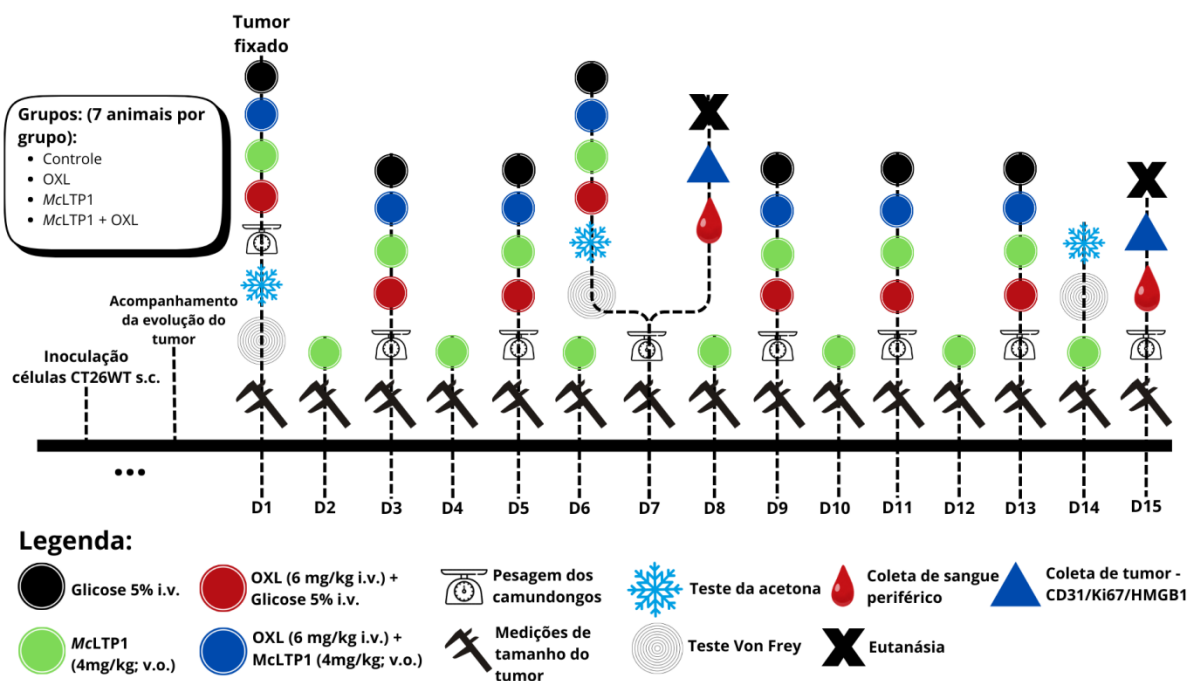
5.6.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos de 7 animais:

- CONTROLE – Animais injetados apenas com o veículo da oxaliplatina (glicose 5% i.v.)
- *McLTP*₁ – animais administrados com *McLTP*₁ (4mg/kg; v.o.)
- OXL – animais injetados com oxaliplatina (OXL; 6 mg/kg i.v.) + veículo da *McLTP*₁ (salina; v.o.)
- *McLTP*₁ +OXL – animais injetados com *McLTP*₁ (4mg/kg; v.o.) e oxaliplatina (OXL; 6 mg/kg i.v.)

A *McLTP*₁ foi administrada diariamente e nos dias coincidindo com as injeções de oxaliplatina, foi administrada 60 minutos antes da mesma.

ILUSTRAÇÃO 10: Desenho experimental



Fonte: autor, 2024. A figura mostra o protocolo experimental com os dias (D1 – D15) de administração da proteína e do fármaco, medidas do tumor, pesagem dos animais, testes nociceptivos, coleta de sangue e do tumor.

5.11 Avaliação da NSP - testes comportamentais

5.11.1 Alodínia mecânica plantar

Para avaliar o desenvolvimento de alodínia mecânica plantar, foi utilizada uma série de filamentos de von Frey (Ugo Basile[®]) de intensidade crescente (0,008 – 2,0 g), baseado no método “up-down” de Chaplan *et al.* (1994). Para adaptação, 30 minutos antes do início do teste comportamental, os animais foram acomodados em gaiolas de acrílico (9 x 7 x 11 cm) colocadas em cima de uma plataforma elevada de malha de arame, permitindo o acesso à região plantar das patas traseiras dos camundongos. Com os filamentos de von Frey, foi exercido um estímulo mecânico na região plantar central da pata traseira direita do camundongo, com uma pressão suficiente para dobrar o filamento.

Após o estímulo mecânico, foi observada a resposta nociceptiva do animal, considerada como a flexão da pata seguida de um “flinch” (comportamento de balançar a pata).

As respostas positivas foram definidas como movimentos de retirada do membro posterior direito ou lambidas imediatamente após estimulação mecânica. Foram excluídas as respostas seguidas de caminhada. (CUNHA *et al.*, 2004; MARTINOV *et al.*, 2013. Quando ocorria uma resposta nociceptiva, era escolhido o próximo filamento com menor força.

Desse modo, o filamento de menor força capaz de provocar o comportamento nociceptivo foi instituído como sendo o limiar mecânico do camundongo. Este teste foi realizado antes (medida basal) e ao longo das administrações da oxaliplatina, uma por semana, até o 14^o dia experimental. Os valores obtidos foram apresentados como log₁₀ (força [mg]).

5.11.2 Alodínia térmica pelo frio

Para avaliar a hipersensibilidade ao frio, os animais foram distribuídos sobre uma plataforma com pavimento de malha perfurada de metal (célula de 0,8 x 0,8 cm), contendo compartimentos de acrílico transparente (8 x 8 x 18 cm), elevada a 30 cm da superfície para permitir acesso a região central das patas. Um espelho foi posicionado

abaixo dos compartimentos de acrílico para facilitar a observação das patas. (CHOI *et al.*, 1994; CASPANI *et al.*, 2009; GAUCHAN *et al.*, 2009). Após a ambientação dos animais, o teste frio foi medido 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 µl 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 foram contabilizados 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). Os valores obtidos foram expressos como média ± 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.

5.12 Coleta e processamento das amostras tumorais

Para a retirada de amostras, 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, 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)

Para a coleta do sangue 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 µL de sangue que foram imediatamente diluídos e

homogeneizado em 380 μ L de solução de azul de Turk (Ácido acético 2%, Violeta Genciana 0,2%).

5.13 Leucometria total e diferencial em sangue periférico.

No 24º dia de experimento, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). E após a verificação de não resposta motora foi realizado a coleta de sangue do plexo retroorbital para contagens total e diferencial de leucócitos em solução de Turk (ácido acético 2%, violeta Genciana 0,2%), Para a contagem total foram coletados 20 μ L de sangue que foram imediatamente diluídos e homogeneizado em 380 μ L de solução de azul de Turk.

O número total de leucócitos plasmáticos foi determinado utilizando-se câmara de Neubauer (Optik Labor), juntamente com um microscópio óptico para verificar o efeito da quimioterapia à base de oxaliplatina na indução da leucopenia.

Os resultados da contagem das células obtidos nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer (Optik Labor) 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 nº 1: solução de triarilmetano 0,1%), 5 vezes no corante ácido (solução nº 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 40X 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 o 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.

5.14 Expressão de Ki67, CD31, HMGB1 em tecido tumoral.

Os tecidos foram processados e congelados, como descrito anteriormente, e foram feitos cortes congelados em criostato (Leica CM1850, Leica, Wetzlar, Alemanha), na espessura de 4 μ m à temperatura de - 24°C. Em seguida, foi realizada a fixação dos tecidos em metanol, por 2 minutos, e a recuperação antigênica em tampão citrato de sódio 0,1M (pH 6,0) em banho-maria, à temperatura de 95 °C, por 18 minutos. Após o resfriamento, em temperatura ambiente, durante 20 minutos, foi realizada a permeabilização da membrana nuclear com triton X-100 0,1%, durante 10 minutos. Com a finalidade de bloquear ligações inespecíficas, foi utilizada glicina 0,3M dissolvida em albumina sérica bovina (BSA) 5%, por 30 minutos. Após esses procedimentos, as secções dos tecidos foram incubadas, durante a noite, à temperatura de 2-8°C, com os anticorpos primários feitos em coelho (rabbit) anti- Ki67 (Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, USA), anti-CD31 Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, USA), anti-HMGB1 (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). No dia seguinte foi feita a lavagem com PBS e a incubação com o anticorpo secundário (Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 568 Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) por 1 hora e 30 minutos, na diluição de 1: 400. O DAPI (4 μ L em 200 mL de PBS; 30 minutos) foi utilizado para a marcação dos núcleos celulares. As lâminas foram montadas com Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e fotografadas no sistema multi-espectral *in vitro* Cytation 3 – Biotek com padronização dos parâmetros “master gain” e “digital offset” para posterior análise

5.15 Análise das imagens de imunofluorescência

Com as fotomicrografias obtidas, foi realizada a quantificação da área fluorescente utilizando um software de (Fiji Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA). Antes da quantificação, foi realizada a diferenciação dos pixels fluorescentes pela maior saturação de cor associada à fluorescência (vermelha ou verde). Os limites inferior e superior foram padronizados através do limiar de cores para a definição dos pixels selecionados e não selecionados. Os resultados foram apresentados em percentagem, que foi calculada comparando a fluorescência dos marcadores investigados com a fluorescência do DAPI que foi considerada como 100%.

5. 16 Análise estatística.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) ou desvio padrão (DP). Os dados foram verificados quanto a normalidade usando teste de Shapiro-Wilk. Nos testes comportamentais, as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram averiguadas através da análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey. Para as outras análises, foi realizada ANOVA de uma via, com posterior teste de Tukey. Para o cálculo da IC₅₀ dos experimentos *in vitro*, os valores obtidos foram transformados em função logarítmica (Log[X]), depois normalizados e em seguida foi feita uma análise por regressão não linear. O nível de significância foi determinado em $p < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o “software” GraphPad Prism versão 8.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS

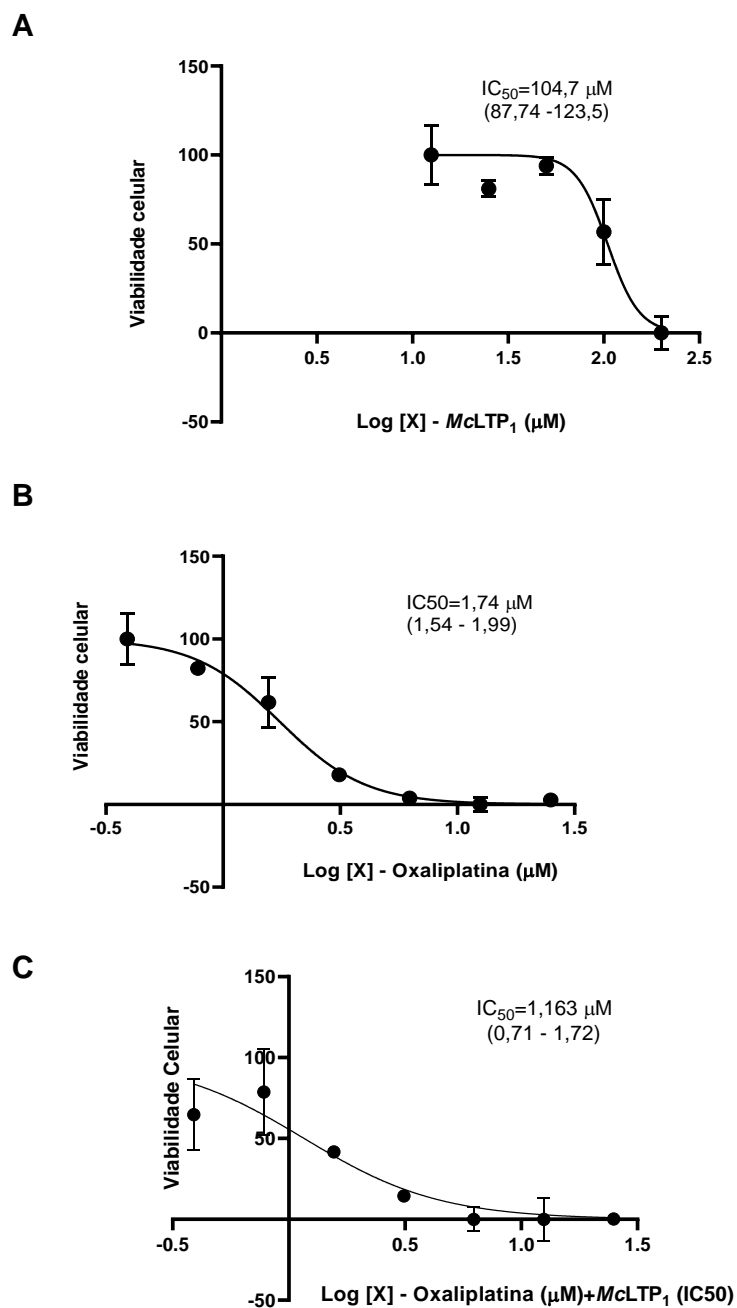
6.1 Avaliação do efeito citotóxico, *in vitro* nos tempos de 48 horas, 72 horas e 96 horas

6.1.1 Avaliação do efeito citotóxico, *in vitro*, da oxaliplatina, *McLTP*₁ e da combinação de ambas em células CT26.WT e determinação das concentrações inibitórias IC₅₀ no tempo de 48 horas.

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT pós 48 horas da incubação das células com os tratamentos. Os resultados mostram que *McLTP*₁ obteve um efeito citotóxico com IC₅₀ de 104,7 μM (Figura 1 A) enquanto oxaliplatina demonstrou esse efeito com IC₅₀=1,74 (Figura 1B). Quando os dois tratamentos são combinados observou-se uma discreta redução da IC₅₀ para 1,16 (Figura 1C).

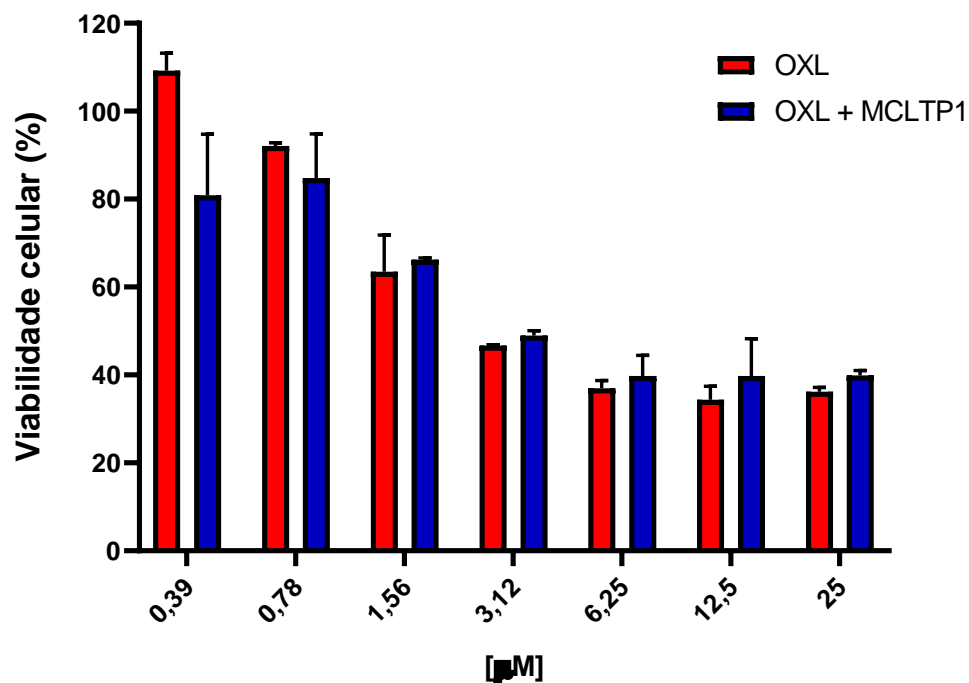
A figura 2 mostra os resultados agrupados da percentagem (%) de células viáveis após 48h. Observa-se que não houve diferença estatística na % de viabilidade celular entre as concentrações de oxaliplatina quando comparado à combinação oxaliplatina com *McLTP*₁.

FIGURA 1. Efeito citotóxico e cálculo da IC_{50} da $McLTP_1$, oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 48h.



Fonte: dados do estudo. Os gráficos mostram a Valores de IC_{50} e o respectivo intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes, realizados em triplicata, pelo método do MTT e a regressão não linear do Log X de concentrações crescentes (μM) de $McLTP_1$ (A), oxaliplatina (B) e da combinação $McLTP_1$ com oxaliplatina (C) sobre a viabilidade celular em células CT26 incubadas por 48h. IC_{50} – concentração inibitória com 50% de efeito. IC_{50} – concentração inibitória com 50% de efeito

FIGURA 2. Efeito citotóxico da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 48h.



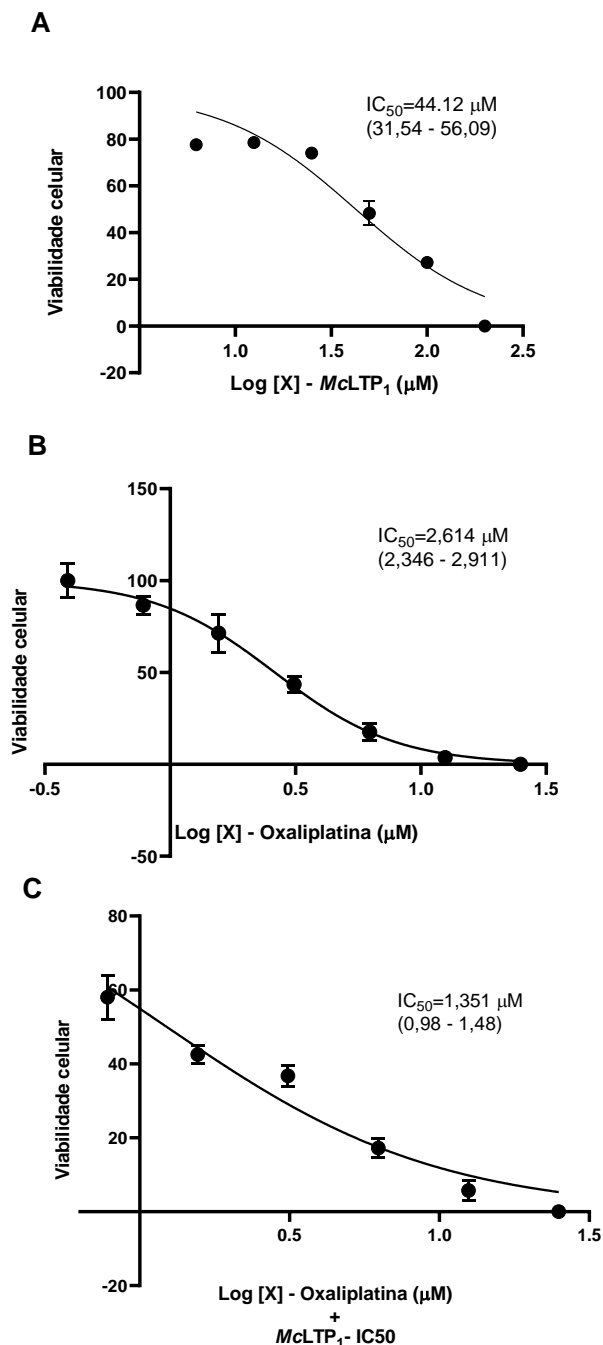
Fonte: dados do estudo. Os gráficos mostram a percentagem (%) de células viáveis após 48h de incubação com concentrações crescentes oxaliplatina (OXL) e da combinação *McLTP*₁ com oxaliplatina (OXL+*McLTP*₁).

6.1.2 Avaliação do efeito citotóxico, *in vitro*, da oxaliplatina, McLTP1 e da combinação de ambas em células CT26.WT e determinação das concentrações inibitórias IC₅₀ no tempo de 72 horas.

Após 72 horas de tratamento os resultados mostram que *McLTP*₁ obteve um efeito citotóxico com IC₅₀ de 44.12 µM (Figura 3A) enquanto oxaliplatina demonstrou esse efeito com IC₅₀ de 2,6 (Figura 3B). Quando os dois tratamentos são combinados observou-se uma redução da IC₅₀ para 1,35 (Figura 3C).

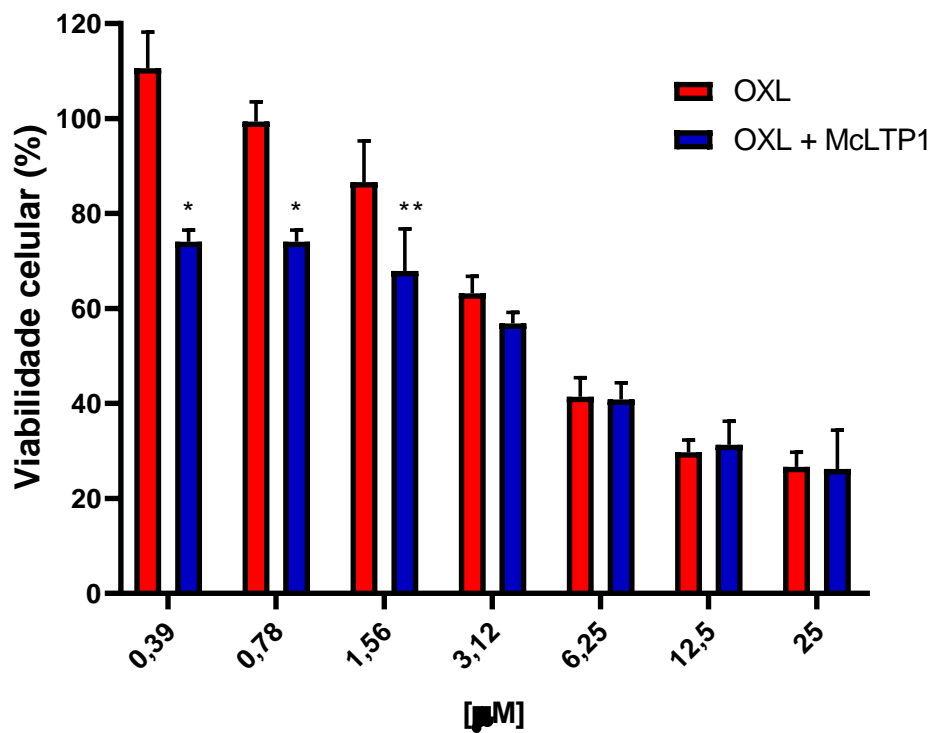
A figura 4 mostra os resultados agrupados da percentagem (%) de células viáveis após 72h. Observa-se que houve diferença estatística na % de viabilidade celular entre as concentrações de oxaliplatina sozinha, quando comparado à combinação *McLTP*₁ (na sua IC₅₀) com oxaliplatina nas concentrações de 1,56 a 0,39 µM.

FIGURA 3. Efeito citotóxico e cálculo da IC_{50} da $McLTP_1$, oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 72h.



Fonte: dados do estudo. Os gráficos mostram a Valores de IC_{50} e o respectivo intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes, realizados em triplicata, pelo método do MTT e a regressão não linear do Log X de concentrações crescentes (μM) de $McLTP_1$ (A), oxaliplatina (B) e da combinação $McLTP_1$ com oxaliplatina (C) sobre a viabilidade celular em células CT26 incubadas por 72h. IC_{50} – concentração inibitória com 50% de efeito.

FIGURA 4. Efeito citotóxico da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 72h.



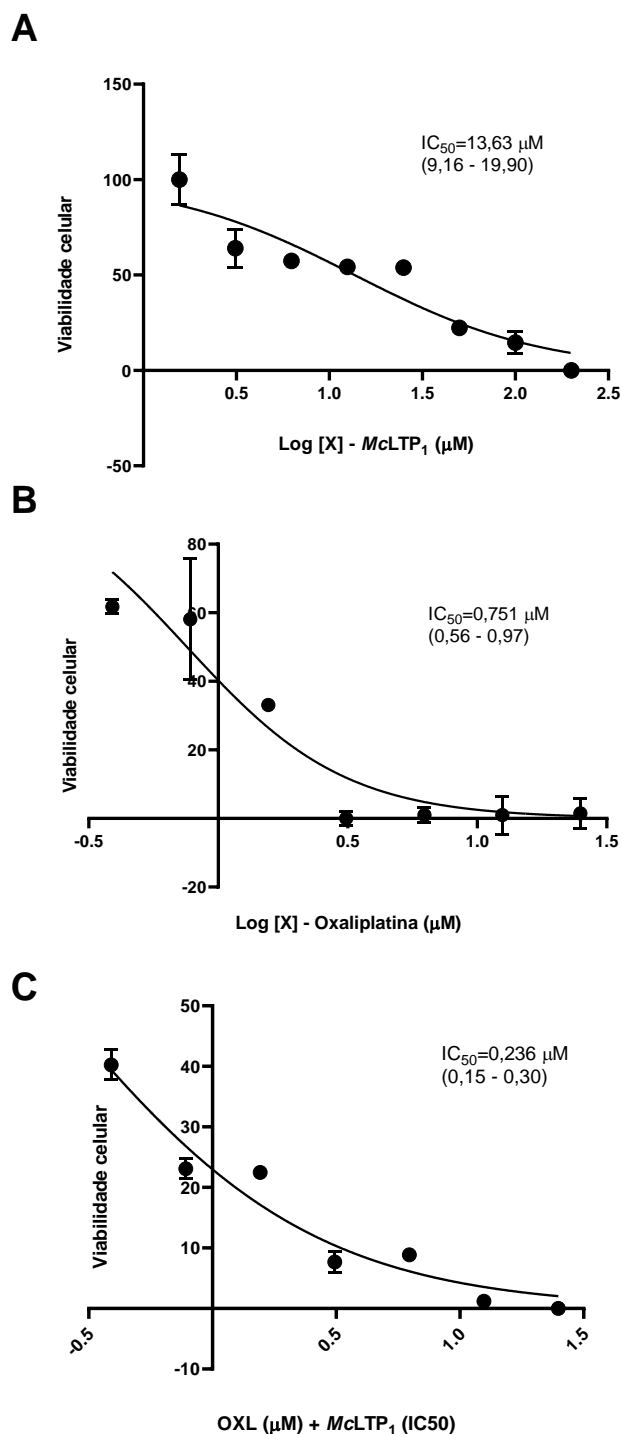
Fonte: dados do estudo. Os gráficos mostram a percentagem (%) de células viáveis após 72h de incubação com concentrações crescentes oxaliplatina (OXL) e da combinação *McLTP*₁ com oxaliplatina (OXL+*McLTP*).

6.1.3 Avaliação do efeito citotóxico, *in vitro*, da oxaliplatina, McLTP1 e da combinação de ambas em células CT26.WT e determinação das concentrações inibitórias IC₅₀ no tempo de 96 horas.

Os resultados mostram que *McLTP*₁ obteve um efeito citotóxico com IC₅₀ de 13,63 μM (Figura 5A) enquanto oxaliplatina demonstrou esse efeito com IC₅₀ de 0,7516 μM (figura 5B). Quando os dois tratamentos são combinados observou-se uma redução da IC₅₀ para 0,236 μM (Figura 5C).

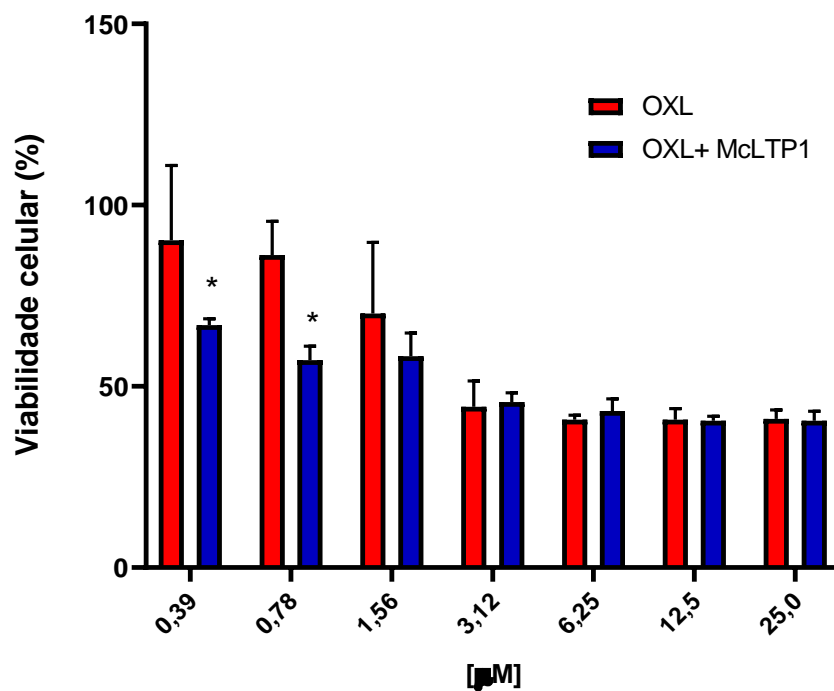
A figura 6 mostra os resultados agrupados da percentagem (%) de células viáveis após 96h. Observa-se que houve diferença estatística na % de viabilidade celular entre as concentrações de oxaliplatina sozinha, quando comparado à combinação *McLTP*₁ (na sua IC₅₀) com oxaliplatina nas concentrações de 1,56 a 0,39 μM.

FIGURA 5. Efeito citotóxico e cálculo da IC_{50} da $McLTP_1$, oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 96h.



Fonte: dados do estudo. Os gráficos mostram a Valores de IC_{50} e o respectivo intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes, realizados em triplicata, pelo método do MTT e a regressão não linear do Log X de concentrações crescentes (μM) de $McLTP_1$ (A), oxaliplatina (B) e da combinação $McLTP_1$ com oxaliplatina (C) sobre a viabilidade celular em células CT26 incubadas por 96h. IC_{50} – concentração inibitória com 50% de efeito.

FIGURA 6. Efeito citotóxico da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação das duas em células CT26.WT cultivadas por 96h.

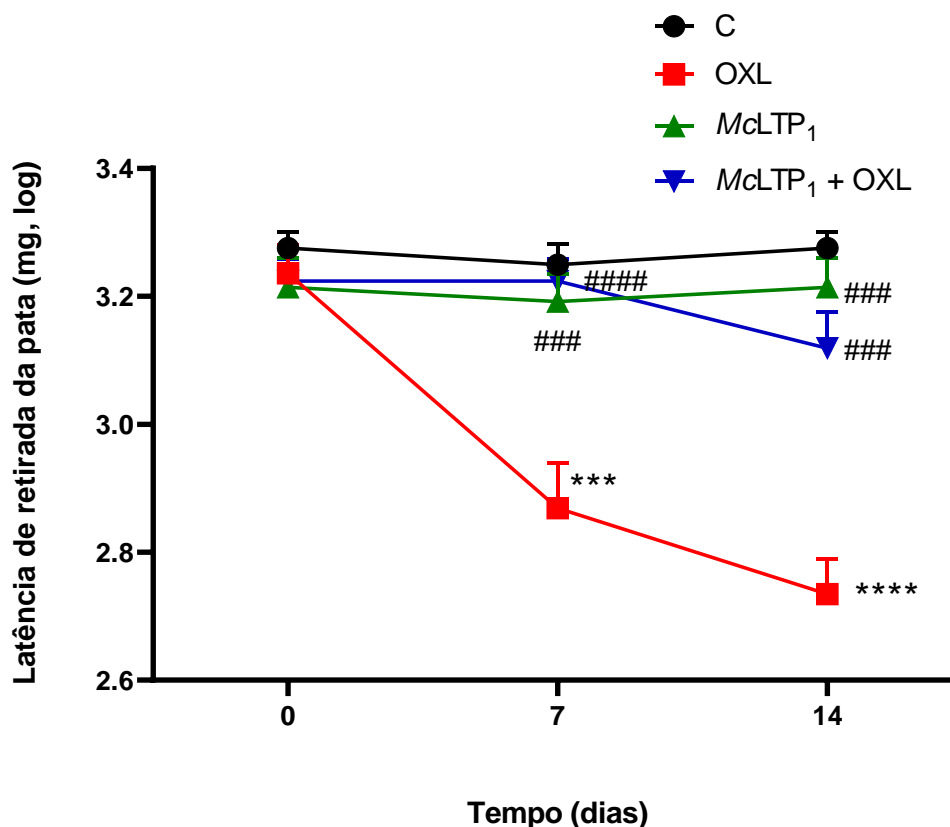


Fonte: dados do estudo. Os gráficos mostram a percentagem (%) de células viáveis após 96h de incubação com concentrações crescentes oxaliplatina (OXL) e da combinação *McLTP*₁ com oxaliplatina (OXL+*McLTP*₁).

6.2 Avaliação da alodínia mecânica plantar em camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina, *McLTP*₁ e com a associação de ambas.

A alodínia mecânica plantar foi avaliada nas patas traseiras dos camundongos pelo teste de filamentos de von Frey antes (tempo zero) e durante 14 dias após o início dos tratamentos. Os dados demonstraram que o grupo tratado com oxaliplatina apresentou uma redução significativa 12,5 % no 7º dia ($p < 0,01$) e de 15,7% ($p < 0,001$) no limiar de retirada da pata no 14º dia, em comparação ao grupo controle. No grupo que recebeu oxaliplatina associada a *McLTP*₁, notou-se uma reversão significativa do limiar de retirada da pata de 100% no 7º dia ($p < 0,001$) e de 96,8% ($p < 0,01$) no 14º dia em comparação ao grupo que recebeu somente oxaliplatina. No grupo tratado com apenas *McLTP*₁ não foi observado alterações no limiar nociceptivo (**FIGURA 7**).

FIGURA 7 - Avaliação da alodínia mecânica plantar em camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com oxaliplatina, *McLTP*₁ e com a associação de ambas por 14 dias.

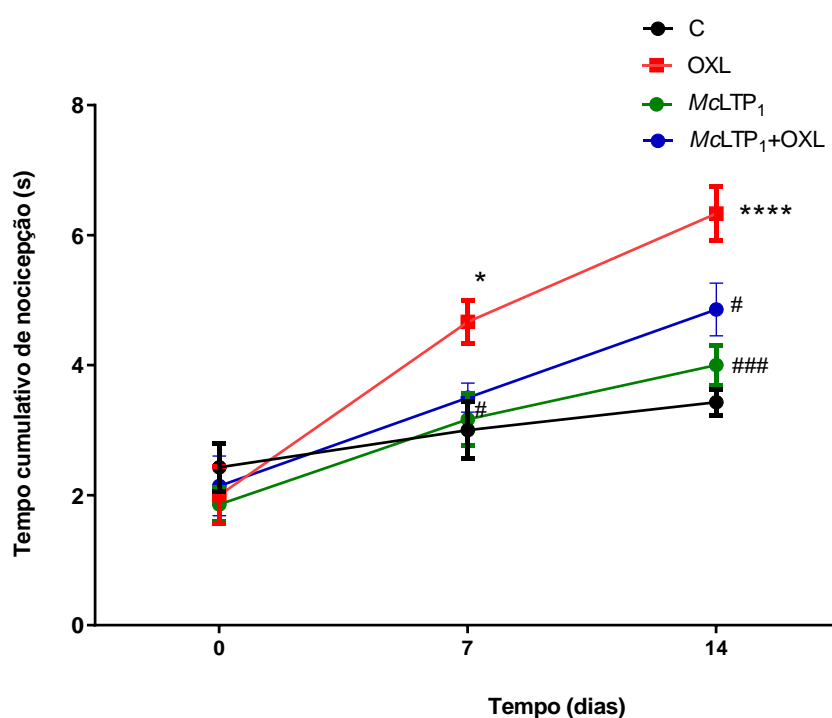


O gráfico representa o desenvolvimento de alodínia mecânica plantar em camundongos que foram submetidos à administração intravenosa de oxaliplatina (OXL, 6mg/kg) e por via oral (gavagem) da proteína *McLTP*₁ (4mg/kg). Os pontos representam a média \pm EPM do limiar de retirada da pata em mg (log) de grupos de 7 animais. *** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$ comparados ao grupo controle (C; glicose 5%) e ### $p < 0,01$ e #### $p < 0,001$ comparado ao grupo OXL (Two-Way ANOVA, seguido de teste de Tukey)

6.3 Avaliação da alodínia térmica pelo frio em camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina, *McLTP*₁ e com a associação de ambas.

A alodínia térmica ao frio foi avaliada antes (tempo zero) e durante 14 dias após o início dos tratamentos. Os dados mostram que grupo tratado somente com oxaliplatina demonstrou um aumento significativo de 53,3% ($p < 0,05$) no tempo acumulativo de nocicepção, no 7º dia, e de 85,2% ($p < 0,001$) no 14º dia. O grupo *McLTP*₁ associada com oxaliplatina houve uma reversão de 70,6% no 7º dia e de 51,8% ($p < 0,05$) no 14º dia, em comparação ao grupo apenas com oxaliplatina. No grupo tratado com apenas *McLTP*₁ não foi observada alterações no tempo cumulativo de nocicepção (**FIGURA 8**).

FIGURA 8 - Avaliação da alodínia térmica pelo frio em camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com oxaliplatina, *McLTP*₁ e com a associação de ambas por 14 dias.



O gráfico representa a progressão da **alodínia térmica pelo frio** (10°C), no teste da acetona, em camundongos submetidos à administração de oxaliplatina (OXL, 6 mg/kg, iv) e *McLTP*₁ (4 mg/kg, vo), no período de 14 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do tempo cumulativo de nocicepção em segundos (s) de grupos de 7 animais. * $p < 0,05$ comparados ao grupo controle (C; glicose 5%) e # $p < 0,05$ comparado ao grupo OXL.

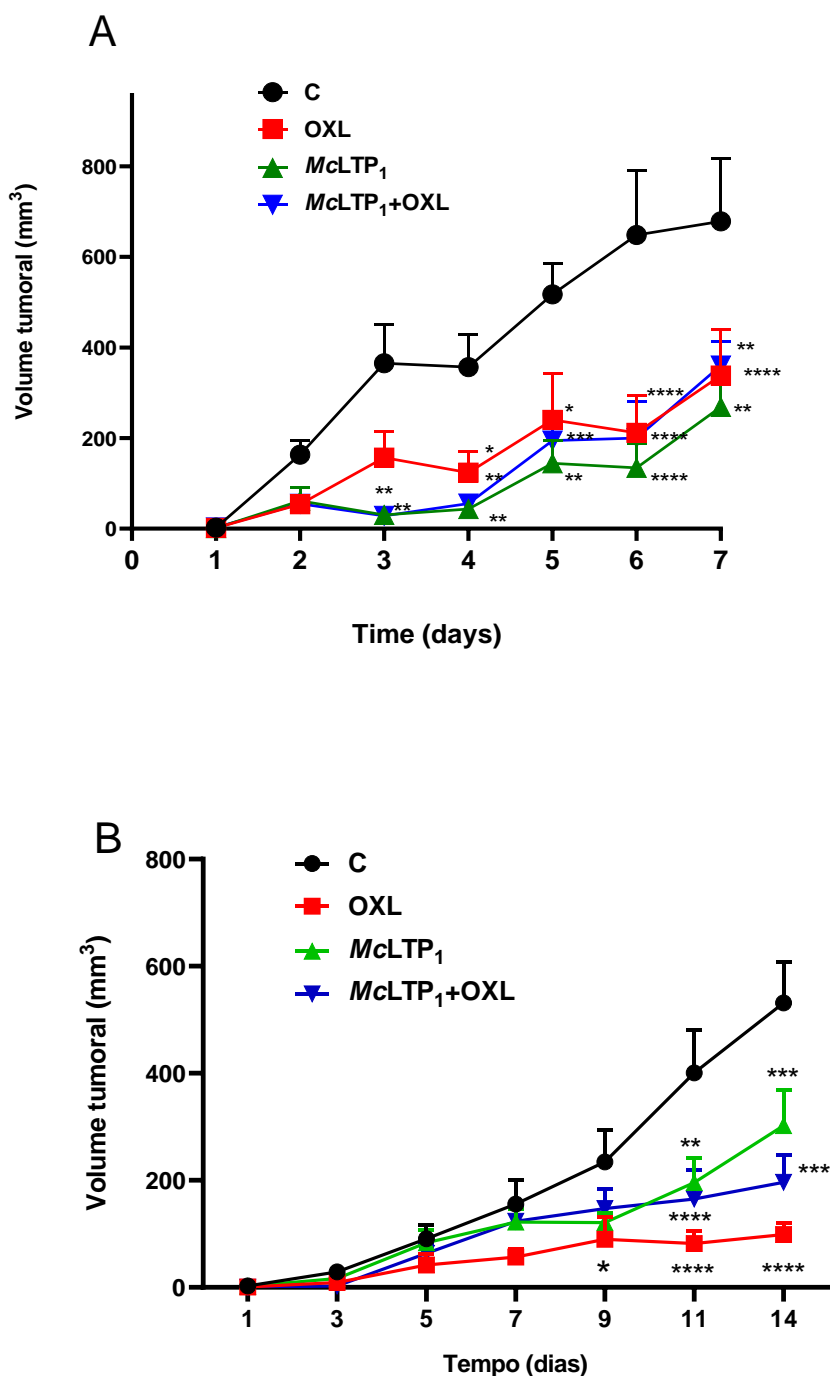
(Two-Way ANOVA, seguido do teste de Tukey)

6.4 Avaliação do efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas no crescimento tumoral em camundongos com tumor de células CT26.WT

A cinética tumoral envolve a análise do crescimento, desenvolvimento e comportamento das células tumorais ao longo do tempo. No experimento com 7 dias, o grupo tratado somente com oxaliplatina mostrou um menor crescimento tumoral com diferença iniciando no 4º dia com 65,3% ($p < 0,05$) de inibição, perdurando até o 7º dia com uma inibição de 50,1% ($p < 0,0001$). O grupo tratado somente com a proteína *McLTP*₁ inibiu o crescimento tumoral à partir do 3º dia de tratamento 92,2% ($p < 0,01$), perdurando até o 7º dia com 59,7% ($p < 0,01$). O grupo que recebeu a associação da oxaliplatina (6 mg/kg) mais a *McLTP*₁ também inibiu o crescimento tumoral a partir do 3º dia com 92,2% ($p < 0,01$), perdurando até o 7º dia com 49,1% ($p < 0,01$). Não observou-se diferenças entre os grupos tratados com *McLTP*₁ e o grupo tratado com oxaliplatina (**FIGURA 9A**). No experimento realizado com 14 dias os resultados reafirmaram o resultado anterior, onde o grupo tratado somente com oxaliplatina inibiu de forma significativa o crescimento tumoral a partir do 9º dia em 61,5%, perdurando até o 14º dia com 81,3% de inibição ($p < 0,05$). No grupo tratado com a *McLTP*₁ a inibição significativa ocorreu a partir do 11º dia com 51,1% ($p < 0,01$) e de 43,1% ($p < 0,001$) no 14º dia. Já o grupo que recebeu a oxaliplatina e a *McLTP*₁ inibiu o crescimento tumoral em 58,8% ($p < 0,0001$) no 11º dia e em 63% ($p < 0,001$) no 14º dia. Neste experimento também não houve a diferença entre os grupos tratados em nenhum dos tempos (**FIGURA 9B**).

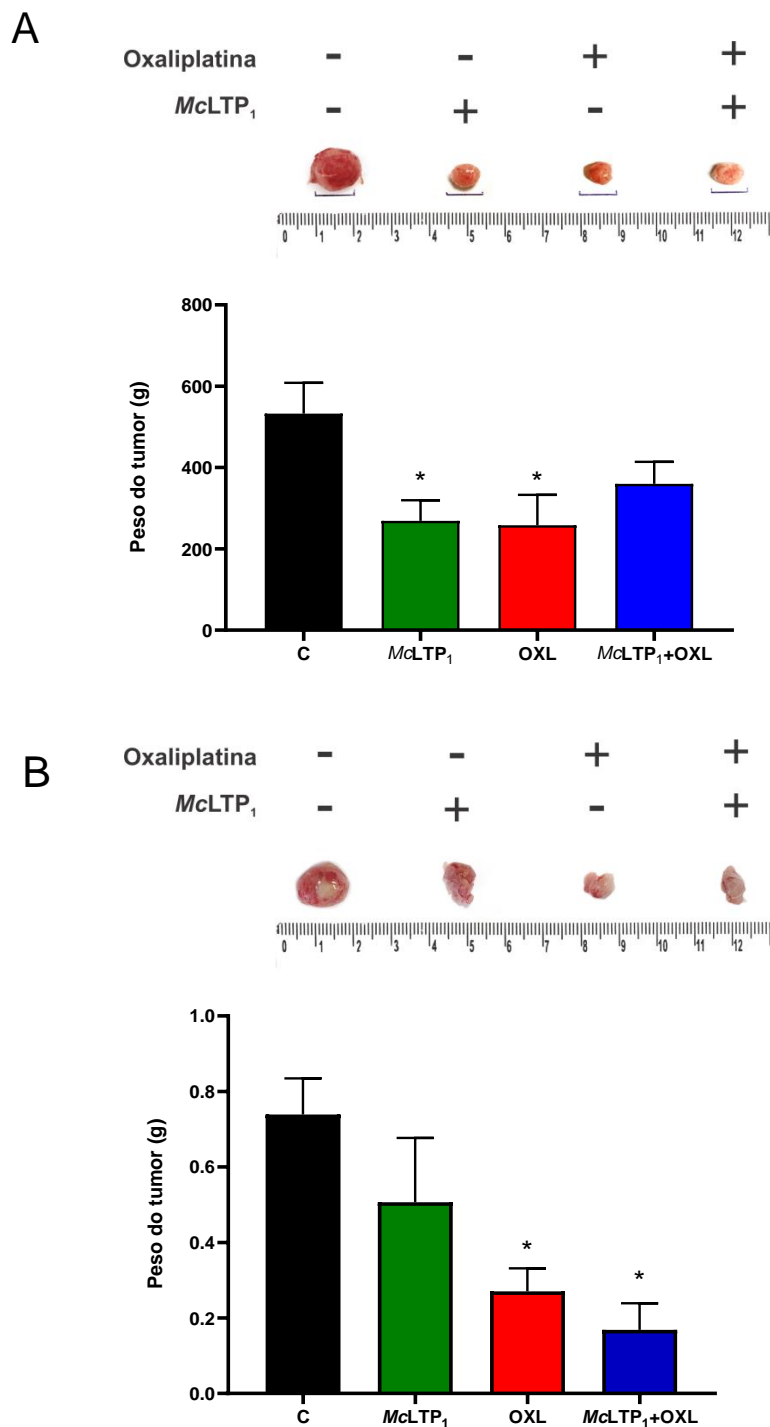
Com relação ao peso úmido do tumor, extraídos ao final dos experimentos de 7 e 14 dias, observou-se uma diminuição significativa nos grupos tratados com oxaliplatina e *McLTP*₁. No experimento de 7 dias o peso foi inibido em 52,8 e 50,9% ($p < 0,05$) nos grupos tratados com oxaliplatin e *McLTP*₁ (respectivamente). O grupo tratado com a combinação de *McLTP*₁ e Oxaliplatina, apesar da diminuição no tamanho, não obteve diferença estatística com relação ao grupo controle, assim como não foi diferente do grupo tratado somente com a oxaliplatina (Figura 10A). No experimento de 14 dias, somente os grupos tratados com oxaliplatina e a combinação oxaliplatina com *McLTP*₁ diminuiram significativamente o peso úmido do tumor com 76,1% e 78% ($p < 0,05$) de inibição (Figura 10B).

FIGURA 9: Avaliação do efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas na cinética do volume tumoral em camundongos com tumor de células CT26.WT.



Fonte: dados do estudo. O gráfico representa a cinética do volume tumoral durante 7 dias (A) e durante 14 dias (B), em camundongos submetidos à administração crônica de oxaliplatina (OXL; 6 mg/kg, iv) e *McLTP*₁ (4 mg/kg, vo). O grupo controle (C) foi injetado com o veículo da OXL (glicose 5%). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do volume tumoral em mm³. Os pontos representam os grupos de 7 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparados ao grupo controle. (Two-Way ANOVA, seguido do teste de Tukey).

FIGURA 10. Avaliação do efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas no peso úmido tumoral em camundongos com tumor de células CT26.WT.

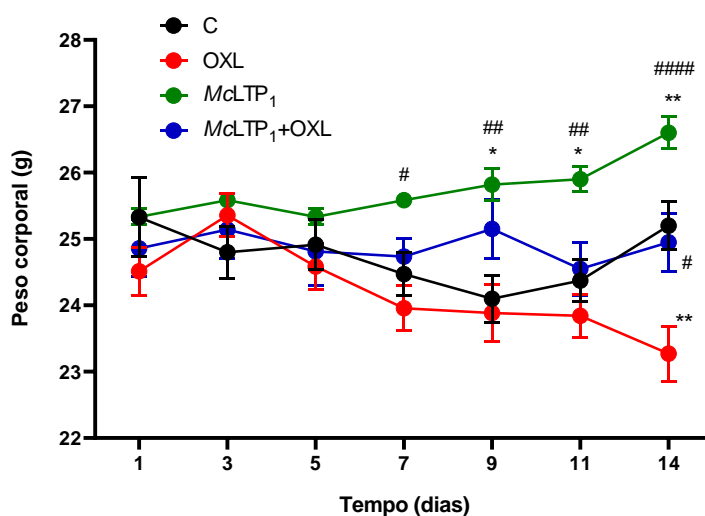


Fonte: dados do estudo. O gráfico representa o peso úmido do tumor retirado no 7º (A) e 14º dias (B) após o tratamento com oxaliplatina (OXL; 6 mg/kg, iv) e *McLTP*₁ (4 mg/kg, vo). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM) do peso em gramas (g). As fotos mostram o tumor representativo de cada grupo dissecados no 7º dia (A) e 14º dia (B). O grupo controle (C) foi injetado com o veiculo da OXL (glicose 5%). Os pontos representam os grupos de 7 animais. * $p < 0,05$ comparados ao grupo controle (One-Way ANOVA, seguido do teste de Tukey)

6.5 Avaliação do peso corporal de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e $McLTP_1$ ou combinação de ambas.

O peso corporal foi avaliado no experimento de 14 dias. Os dados mostram que no grupo tratado somente com oxaliplatina houve uma perda de peso corporal em cerca de 4,8% no final do experimento, com uma diferença em relação ao grupo controle de 7,9% no 14º dia ($p < 0,01$). No grupo que foi tratado com a oxaliplatina em associação com a proteína, não foi observado perda de peso, mantendo-se com cinética de peso semelhante ao grupo controle, o qual também não houve alterações. O grupo tratado somente com $McLTP_1$, teve um perfil de ganho ponderal diferente dos outros grupos, onde observou-se um aumento significativo do peso corporal a partir do 9º dia ($p < 0,05$), mantendo-se mais elevado do que o controle até o 14º dia, com um aumento de 5% quando comparamos o peso inicial com o peso no final do experimento, e em 5,5% ($p < 0,01$) quando comparado ao controle no 14º dia. Observa-se uma diferença significativa também deste grupo em comparação ao grupo que recebeu somente oxaliplatina, com diferenças significativas, a partir do 7º dia ($p < 0,05$) até o 14º dia, com 12,7% de diferença ($p < 0,001$), conforme visualizado na FIGURA 11.

FIGURA 11 Avaliação do peso corporal de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina, $McLTP_1$ ou combinação de ambas por 14 dias.



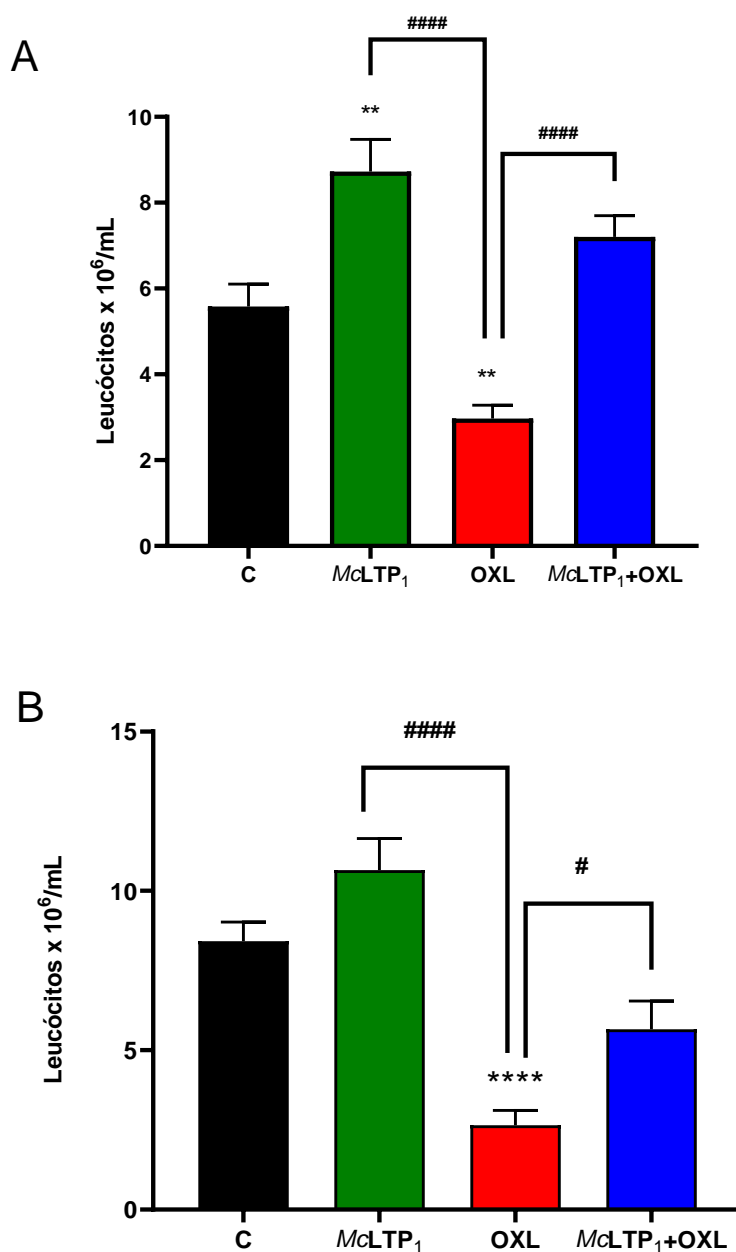
Fonte: dados do estudo. A figura representa a cinética do peso corporal, em camundongos com tumor de CT26.WT, submetidos à administração crônica de oxaliplatina (6 mg/kg, iv) e $McLTP_1$ (4 mg/kg, vo). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média

(EPM) do peso corporal em gramas (g). Os pontos representam os grupos de 7 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparados ao grupo controle (glicose 5%) e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo OXL.

6.5 Avaliação da leucometria total em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e *McLTP*₁ ou combinação de ambas por 7 e 14 dias.

No final do experimento, durante a eutanásia, foi realizada a coleta sanguínea por punção do plexo retro-orbital para a contagem total de leucócitos. Os resultados do experimento de 7 dias mostram que o grupo oxaliplatina teve uma diminuição significativa de 46,7% ($p < 0,05$) nos leucócitos totais quando comparamos ao grupo controle, enquanto no grupo tratado somente com *McLTP*₁ observou-se um aumento significativo de 43,5% ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle. O grupo tratado com a associação de *McLTP*₁ e oxaliplatina não mostrou diferenças com relação ao grupo controle, porém quando comparamos ao grupo tratado somente com oxaliplatina observa-se uma prevenção da leucopenia em 130,9% ($p < 0,05$) (FIGURA 12A.). No experimento de 14 dias de tratamento os resultados obtidos mostram que o grupo oxaliplatina teve uma diminuição de 68,6% ($p < 0,0001$) quando comparamos ao grupo controle. Os grupos tratados com *McLTP*₁ e com a associação da oxaliplatina com a *McLTP*₁ não mostraram diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle. Porém o grupo tratado com a associação observa-se uma prevenção significativa da leucopenia em 66,7% quando comparado ao grupo tratado somente com oxaliplatina (FIGURA 12B).

FIGURA 12 - Avaliação da leucometria total em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e *McLTP*₁ ou combinação de ambas por 7 (A) e 14 dias (B).



Fonte: dados do estudo. O gráfico representa contagem total de leucócitos em sangue periférico dos animais inoculados com células CT26.WT, submetidos à administração de oxaliplatina (6 mg/kg, iv) e *McLTP*₁ (4 mg/kg, vo) por 7 dias (A) e 14 dias (B). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número total de leucócitos por mL de sangue de grupos de 7 animais. **** $p < 0,0001$ comparados ao grupo controle (glicose 5%) e # $p < 0,05$, #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo OXL (One-Way ANOVA seguido de teste de Tukey)

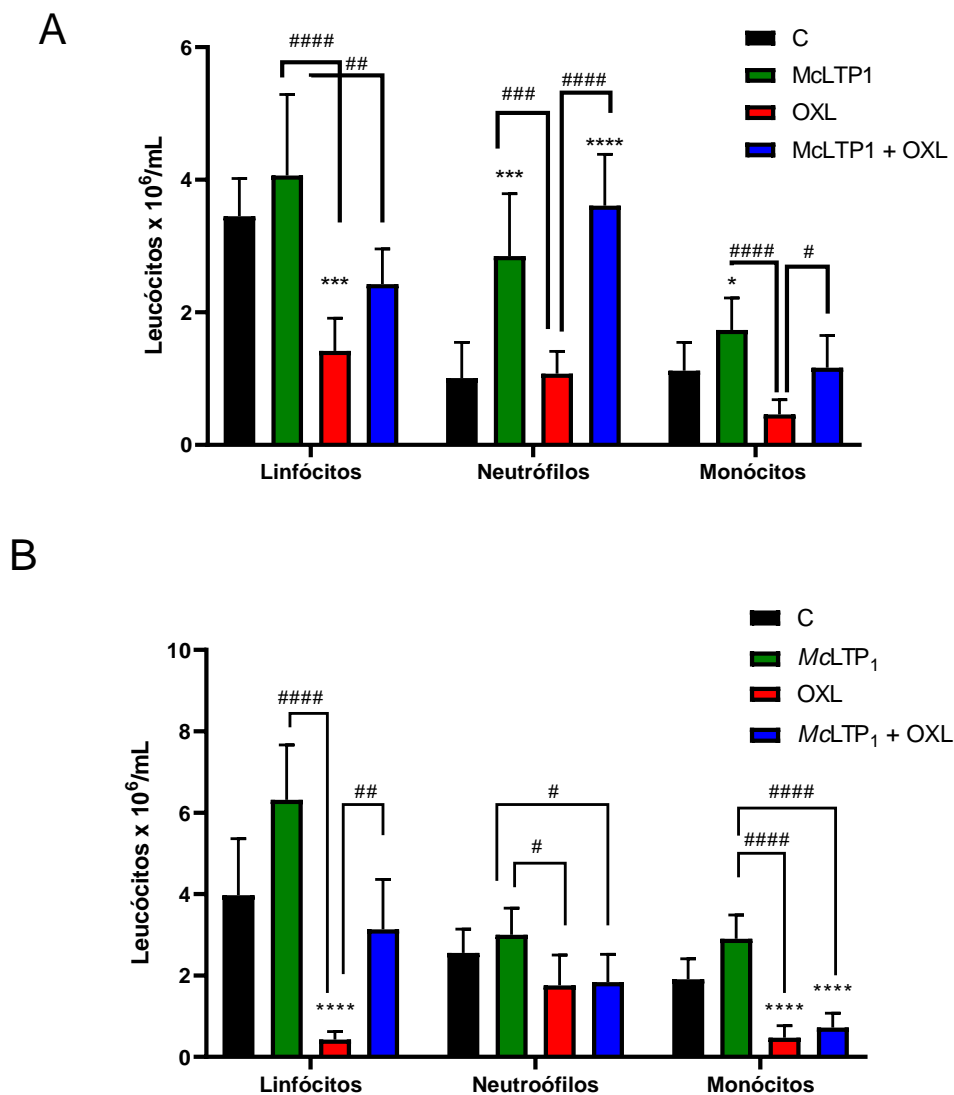
6.7 Avaliação da leucometria diferencial em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e *McLTP*₁ ou combinação de ambas

A avaliação da leucometria diferencial no experimento de 7 dias mostra que, nos linfócitos, a administração de oxaliplatina resultou em uma diminuição significativa de 59,2% ($p < 0,05$), enquanto Os grupos tratados com *McLTP*₁ e com a associação da oxaliplatina com a *McLTP*₁ não mostraram diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle. Quando comparamos o grupo que recebeu a associação com o grupo que recebeu somente oxaliplatina, observa-se uma prevenção da diminuição do número de linfócitos em 70,5% ($p < 0,01$). Nos neutrófilos, o tratamento com oxaliplatina não alterou a contagem, entretanto a *McLTP*₁ gerou um aumento significativo de 285% ($p < 0,05$) em comparação ao grupo. A combinação oxaliplatina com *McLTP*₁ apresentou um aumento de 361% ($p < 0,05$), em comparação ao grupo controle e de 360% em comparação ao grupo oxaliplatina. Quanto aos monócitos, o grupo *McLTP*₁ aumentou significativamente em 54,4% ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle enquanto o grupo tratado somente com oxaliplatina não alterou de forma significativa essas células. O grupo que recebeu a combinação de oxaliplatina e *McLTP*₁ mostrou uma diferença significativa com relação ao grupo oxaliplatina sozinha, aumentando em 103,5% ($p < 0,05$), conforme ilustrado na FIGURA 13A.

Os dados obtidos no experimento de 14 dias mostraram que, nos linfócitos, a administração de oxaliplatina diminuiu de forma significativa em 89,5% ($p < 0,0001$), enquanto o grupo tratado com *McLTP*₁ apresentou um aumento de 36,2% ($p < 0,05$), Já o grupo que recebeu a combinação de oxaliplatina e *McLTP*₁ não mostrou diferença em comparação ao grupo controle. O grupo tratado com a combinação de oxaliplatina com *McLTP*₁ mostrou uma prevenção da linfopenia, revertendo em 78,8% ($p < 0,01$). Nos neutrófilos não foi observada nenhuma alteração significativa entre os grupos com 14 dias de tratamento. Quanto aos monócitos, o grupo tratado apenas com oxaliplatina apresentou uma diminuição de 24,7% ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e o grupo *McLTP*₁ provocou um aumento de 130,5% ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. O grupo que recebeu a combinação de oxaliplatina e *McLTP*₁ reverteu em 32,1% ($p < 0,05$) o efeito da oxaliplatina, ficando com o número de monócitos próximo ao do grupo controle. Todos os resultados acima estão ilustrados na FIGURA 13 B. As tabelas 1 e 2 mostram as medias e desvios padrão dos grupos e também a percentagem de

linfócitos, monócitos e neutrófilos, com relação ao total de leucócitos. Essa porcentagem é diferente dependendo do grupo avaliado

FIGURA 13 - Avaliação da leucometria diferencial em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e *McLTP* 1 ou combinação de ambas por 7 (A) e 14 dias (B).



Fonte: dados do estudo. O gráfico representa contagem total de leucócitos em sangue periférico dos animais inoculados com células CT26.WT, submetidos à administração de oxaliplatina (6 mg/kg, iv) e *McLTP*₁ (4 mg/kg, vo) por 7 dias (A) e 14 dias (B). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM) do número de linfócitos, neutrófilos e monócitos por mL de sangue de grupos de 7 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparados ao grupo controle (glicose 5%) e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ comparado ao grupo OXL (One-Way ANOVA seguido de teste de Tukey)

TABELA 1: Valores da contagem total e diferencial de leucócitos em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e *McLTP* 1 ou combinação de ambas por 7 dias

Parâmetros (unidade)	Média ± DP Mín e Máx Grupo Controle	Média ± DP Mín e Máx Grupo OXL	Média ± DP Mín e Máx Grupo <i>McLTP</i>1	Média ± DP Mín e Máx Grupo <i>McLTP</i>1 + OXL
Leucócitos totais (10⁶/mL)	5,6 ± 1,39 (4,35 - 8,4)	3,0 ± 0,82 (1,55 - 4,2)	9,3 ± 2,2 (5,75 - 12,47)	7,2 ± 1,31 (5,6 - 9,2)
Linfócitos (10⁶/mL)	3,4 ± 0,57 (2,67 - 4,37)	1,4 ± 0,50 (0,79 - 2,39)	4,7 ± 1,97 (2,24 - 8,35)	2,4 ± 0,53 (1,75 - 3,20)
Neutrófilos (10⁶/mL)	1,0 ± 0,54 (0,48 - 2,10)	1,1 ± 0,34 (0,59 - 1,43)	2,8 ± 0,94 (1,50 - 4,61)	3,6 ± 0,77 (2,35 - 4,56)
Monócitos (10⁶/mL)	1,1 ± 0,42 (0,65 - 1,93)	0,5 ± 0,22 (0,17 - 0,80)	1,7 ± 0,48 (0,86 - 2,30)	1,2 ± 0,48 (0,56 - 1,84)
Linfócitos (%)	35%	20%	30%	35%
Neutrófilos (%)	45%	50%	45%	40%
Monócitos (%)	20%	30%	25%	30%

Fonte: dados do estudo. Os valores correspondem à análise efetuada em 28 animais, submetidos a 7 dia de tratamento com oxaliplatina (6 mg/kg, iv) e *McLTP*₁ (4 mg/kg,vo). Os resultados estão expressos como média, Desvio padrão, máximo e mínimo e percentagem (%) por cada grupo de 7 animais.

TABELA 2: Valores da contagem total e diferencial de leucócitos em sangue periférico de camundongos com tumor de células CT26.WT, tratados com oxaliplatina e *McLTP* 1 ou combinação de ambas por 14 dias

Parâmetros (unidade)	Média ± DP Mín e Máx Grupo Controle	Média ± DP Mín e Máx Grupo OXL	Média ± DP Mín e Máx Grupo <i>McLTP</i>1	Média ± DP Mín e Máx Grupo <i>McLTP</i>1 + OXL
Leucócitos totais (10⁶/mL)	8,42 ± 1,58 (5,85 – 10,65)	2,65 ± 1,22 (1,70 – 4,60)	9,13 ± 4,60 (6,90 – 14,55)	4,85 ± 2,91 (2,15 – 8,90)
Linfócitos (10⁶/mL)	3,97 ± 1,39 (2,57 – 4,55)	0,42 ± 0,20 (0,19 – 0,78)	5,41 ± 2,68 (7,86 – 4,00)	2,68 ± 1,63 (1,16 – 4,98)
Neutrófilos (10⁶/mL)	2,55 ± 0,59 (1,52 – 3,27)	1,76 ± 0,75 (1,22 – 2,99)	2,57 ± 1,28 (2,21 – 3,74)	1,58 ± 0,93 (0,70 – 2,84)
Monócitos (10⁶/mL)	1,91 ± 0,51 (0,96 – 2,37)	0,47 ± 0,29 (0,17 – 0,83)	2,49 ± 1,22 (2,20 – 3,74)	0,62 ± 0,42 (0,19 – 1,25)
Linfócitos (%)	35%	20%	30%	35%
Neutrófilos (%)	45%	50%	45%	40%
Monócitos (%)	20%	30%	25%	30%

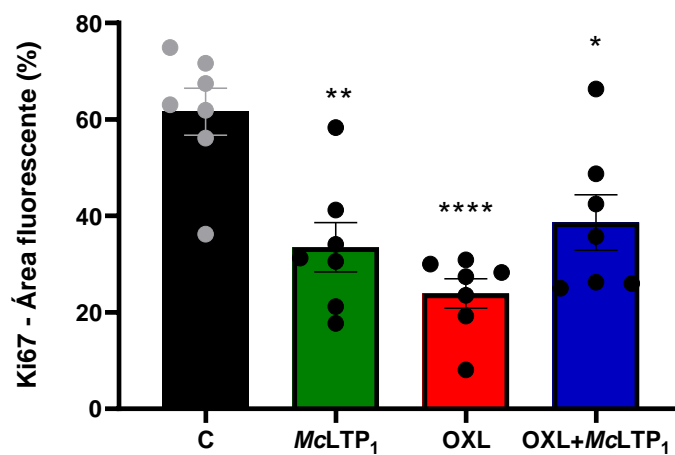
Fonte: dados do estudo. Os valores correspondem à análise efetuada em 28 animais, submetidos a 7 dias de tratamento com oxaliplatina (6 mg/kg, iv) e *McLTP*₁ (4 mg/kg,vo). Os resultados estão expressos como média, Desvio padrão, máximo e mínimo e percentagem (%) por cada grupo de 7 animais.

6.8 Avaliação do efeito da *McLTP*1, oxaliplatina e da combinação de ambas na expressão de Ki67 em tumores de células CT26.WT

A análise da marcação para Ki67 em tecido tumoral por imunofluorescência, ao final do tratamento de 7 dias, apontou redução da expressão de Ki67 em todos os grupos tratados, com inibição de 61,2 (p<0,0001) 45,7 (p<0,01) e 37,3% (p<0,05), respectivamente para oxaliplatina, *McLTP*1 e a combinação de ambos, quando comparados ao grupo controle. Não houve diferenças estatísticas quando comparamos

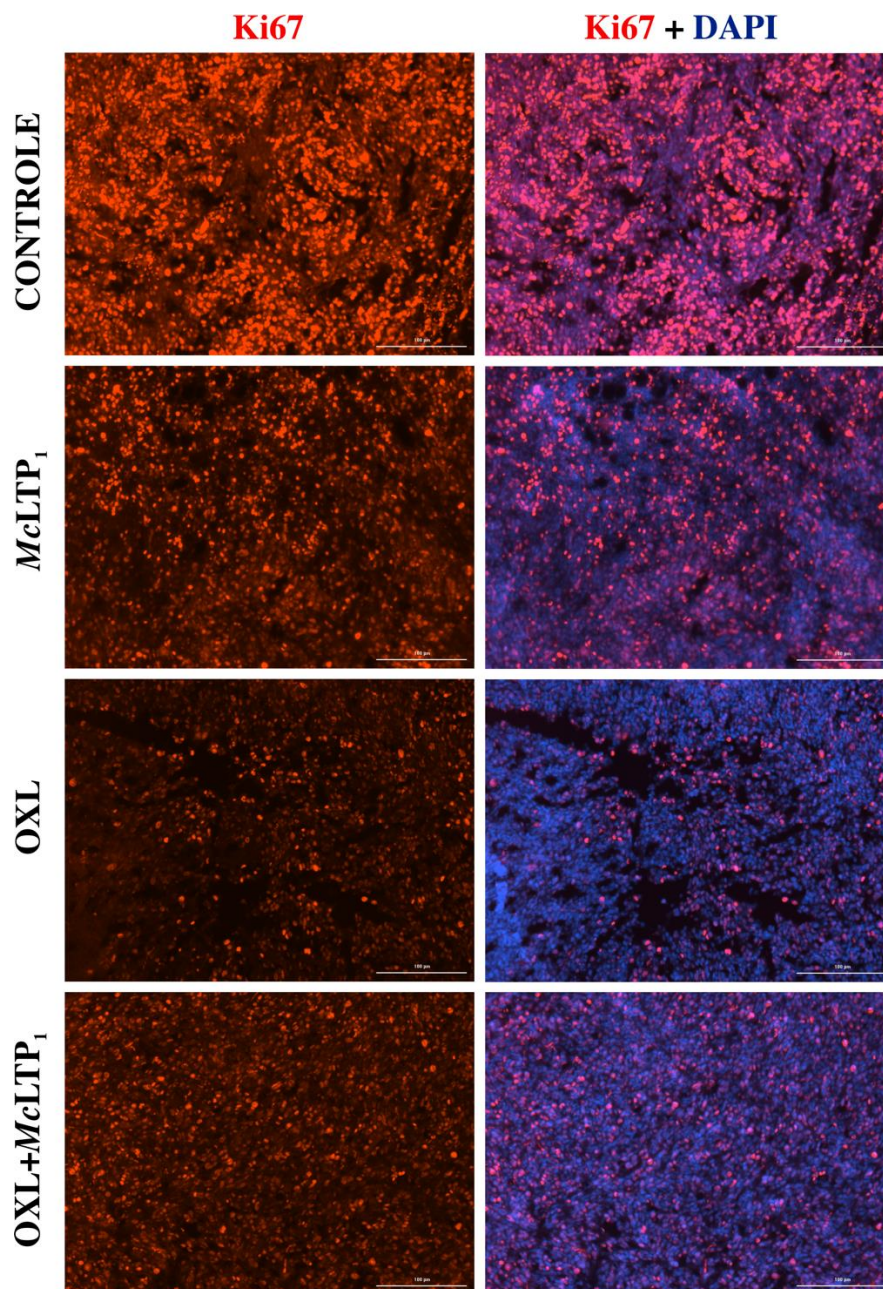
os grupos tratados entre si. (FIGURA 14)..

FIGURA 14 - Efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas na marcação para Ki67 em tumor CT26.WT de camundongos 7º dia pós-tratamento.



As barras representam a média \pm EPM da percentagem (%) da área marcada para Ki67 em amostras tumorais de grupos de 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ (versus controle) (One Way ANOVA, seguido de teste de Tukey).

FIGURA 15 - Fotomicrografias representativas da expressão de Ki67 em amostras tumorais de camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com *McLTP1*, Oxaliplatina ou com a combinação da ambas

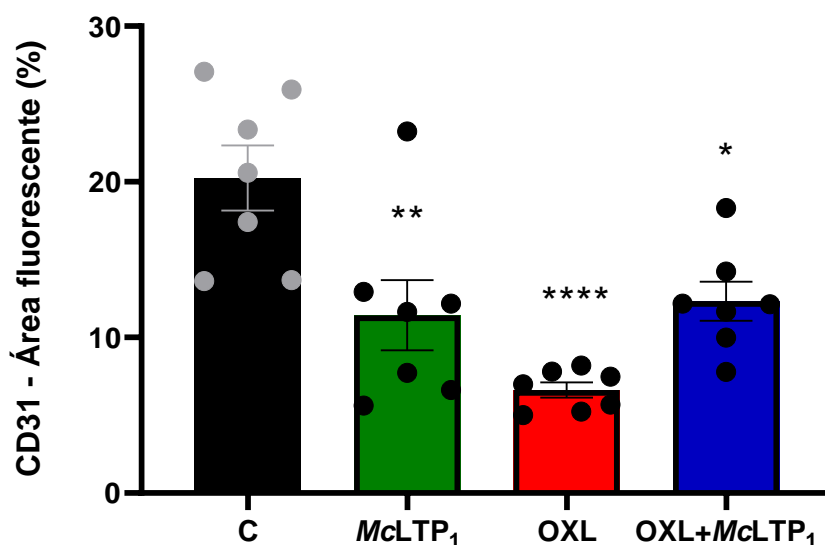


Fonte: Dados do estudo. Vermelho: marcação para Ki67 (Alexa flúor 568), azul: DAPI (marcação do núcleo celular). Aumento de 200X.

6.9 Avaliação do efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas na expressão de CD31 em tumores de células CT26.WT

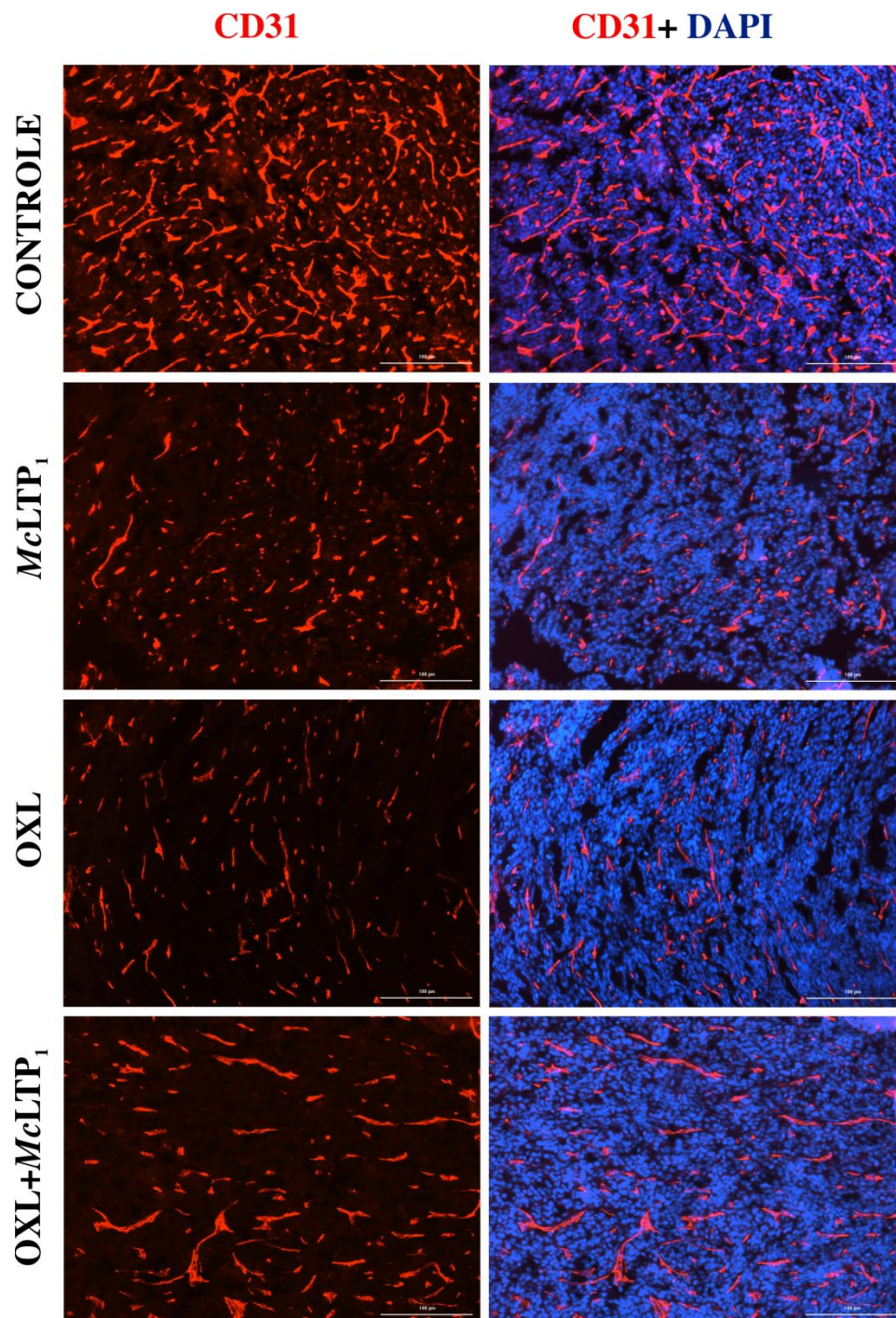
A análise da marcação para CD31 em tecido tumoral por imunofluorescência, ao final do tratamento de 7 dias, apontou redução da expressão de CD31 em todos os grupos tratados, com inibição de 67,4% ($p < 0,0001$) 43,6% ($p < 0,01$) e 39,2% ($p < 0,05$), respectivamente para oxaliplatina, *McLTP*₁ e a combinação de ambos, quando comparados ao grupo controle. Não houve diferenças estatísticas quando comparamos os grupos tratados entre si. (FIGURA 16).

FIGURA 16- Efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas na marcação para CD31 em tumor CT26.WT de camundongos 7º dia pós-tratamento.



As barras representam a média \pm EPM da percentagem (%) da área marcada para CD31 em amostras tumorais de grupos de 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ (versus controle) (One Way ANOVA, seguido de teste de Tukey).

FIGURA 17 – Fotomicrografias representativas da expressão de CD31 em amostras tumorais de camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com *McLTP1*, Oxaliplatina ou com a combinação da ambas

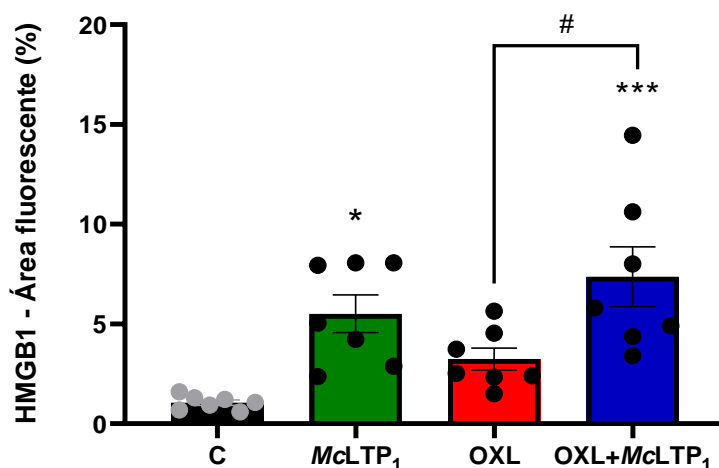


Fonte: Dados do estudo. Vermelho: marcação para CD31 (Alexa flúor 568), azul: DAPI (marcação do núcleo celular). Aumento de 200X.

6.10 Avaliação do efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas na expressão de HMGB1 em tumores de células CT26.WT

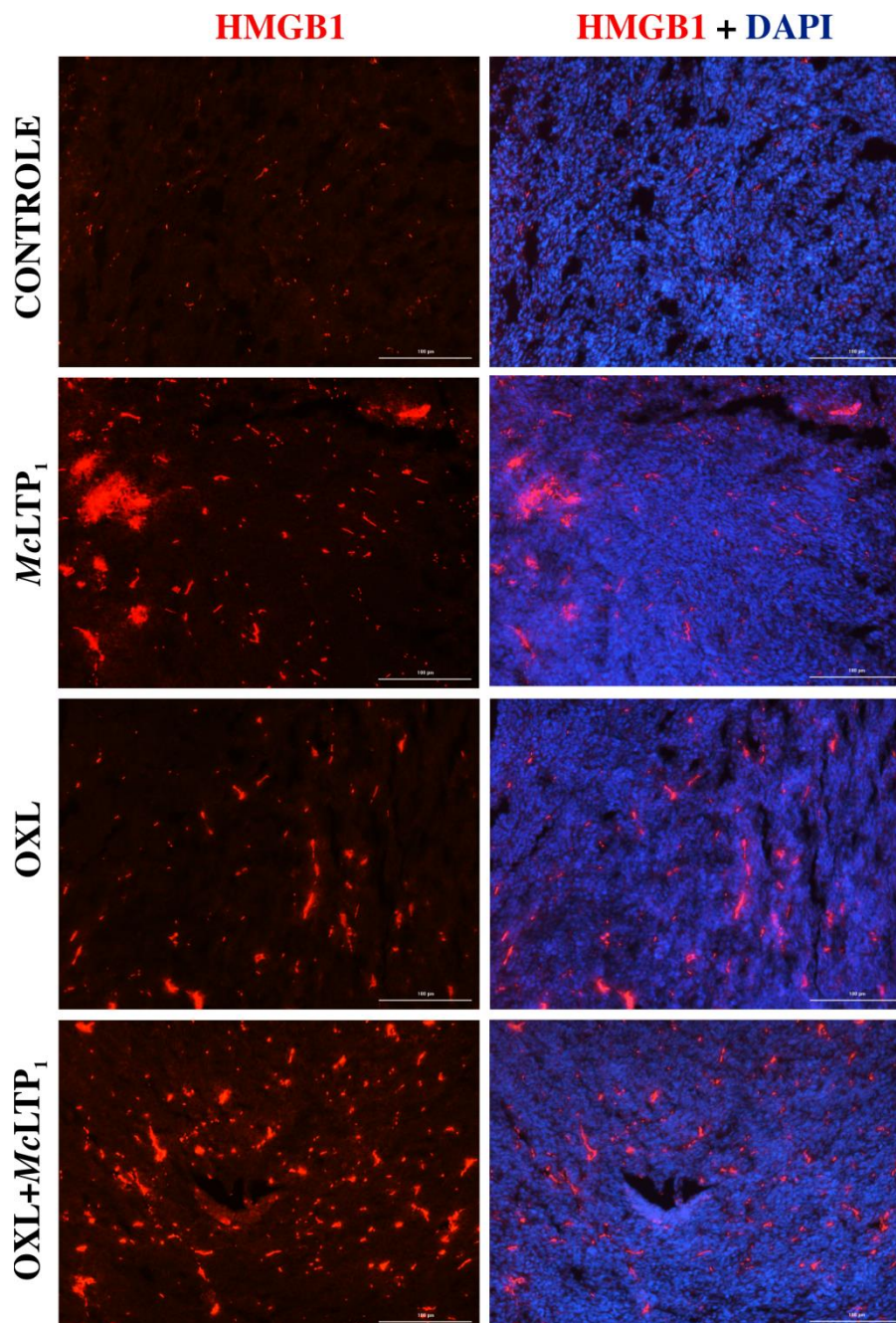
A análise da marcação para HMGB1 em tecido tumoral por imunofluorescência, ao final do tratamento de 7 dias, apontou o aumento da expressão de HMGB1 tanto no grupo tratado com a *McLTP*₁ sozinha, quanto no grupo tratado com a combinação de *McLTP*₁ com oxaliplatina com aumento de 423,2% ($p < 0,05$) e de 595,2% ($p < 0,001$), respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Os tumores extraídos do grupo tratado somente com oxaliplatina não modificou de forma significativa a expressão deste marcador. Quando analisamos os grupos tratados entre si, observamos uma diferença estatística significativa entre o grupo oxaliplatina e o grupo tratado com a combinação de *McLTP*₁ com oxaliplatina, onde houve um aumento de 128% ($p < 0,05$) na marcação para HMGB1 no grupo tratado com a combinação quanto comparado a o grupo tratado somente com oxaliplatina. (FIGURA 18).

FIGURA 18- Efeito da *McLTP*₁, oxaliplatina e da combinação de ambas na marcação para HMGB1 em tumor CT26.WT de camundongos 7º dia pós-tratamento.



As barras representam a média \pm EPM da percentagem (%) da área marcada para HMGB1 em amostras tumorais de grupos de 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ (versus controle) (One Way ANOVA, seguido de teste de Tukey).

FIGURA 19 – Fotomicrografias representativas da expressão de HMGB1 em amostras tumorais de camundongos com tumor de células CT26.WT tratados com *McLTP1*, Oxaliplatina ou com a combinação da ambas



Fonte: Dados do estudo. Vermelho: marcação para HMGB1 (Alexa flúor 568), azul: DAPI (marcação do núcleo celular). Aumento de 200X.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve por finalidade, inicialmente, avaliar o efeito da proteína *McLTP₁* no efeito antitumoral da oxaliplatina, na mesma dose em que é capaz de inibir a neuropatia sensitiva periférica associada a este quimioterápico. A avaliação da possível interferência desta proteína na ação antineoplásica da oxaliplatina é importante para sugerir, por exemplo, sua utilização como adjuvante na prevenção na neuropatia sem prejudicar o tratamento do câncer. Entretanto, no decorrer dos experimentos, foi observado que a *McLTP₁*, quando administrada sem a oxaliplatina, também mostrou um efeito inibitório, inesperado, sobre o crescimento tumoral e sobre a viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, o que contribui para a relevância desta proteína nos estudos na área de oncologia experimental.

A linhagem de célula trabalhada na pesquisa foi a CT26.WT, de uma linha celular de câncer colorretal murino, que é frequentemente utilizada para estudar os efeitos dos tratamentos quimioterápicos, como a oxaliplatina, além de ser um modelo para investigar metástases e o microambiente tumoral em camundongos.

A escolha de células CT26.WT, em camundongos BALB/C em detrimento das células humanas HCT116 em camundongos nude, está relacionado à forma como o sistema imunológico influencia o efeito antitumoral da oxaliplatina que depende deste sistema para exercer seu efeito completo. Os camundongos nude, possuem um timo rudimentar ou a total ausência dele o que faz com que os animais tenham deficiência dos linfócitos T. Em consequências da deficiência de linfócitos T os animais não rejeitam transplante de outras linhagens. São animais menores menos férteis e morrem mais facilmente por serem suscetíveis a infecções (ANDRADE, PINTO e OLIVEIRA, 2002). A deficiência do sistema imune desses animais dificulta o estudo com fármacos que tenham efeito antitumoral dependente do funcionamento deste sistema, como é o caso da oxaliplatina. Assim optou-se pelo modelo de tumor utilizando a CT26.WT pois permite o uso de camundongos imuno competentes. Consequentemente o estudo da citotoxicidade, *in vitro*, também foi feito nessas células.

In vitro, o tratamento a partir de 72 horas de incubação mostrou bons resultados, onde a *McLTP₁* diminuiu a viabilidade celular quando aplicada isoladamente, assim como a oxaliplatina que foi usada como controle positivo. A combinação de *McLTP₁* (na sua IC_{50}) com concentrações crescentes de oxaliplatina, potencializou o efeito citotóxico da oxaliplatina baixando a IC_{50} deste quimioterápico.

Lutif (2015) já havia realizado um estudo de citotoxicidade *in vitro* com concentrações crescentes de *McLTP*₁ em algumas linhagens de células cancerígenas. Os resultados mostraram um bom efeito citotóxico em linhagem de câncer de ovário, mas não na linhagem HCT116 de câncer de colon humano e nem na linhagem de glioblastoma. Não foi testado a combinação da *McLTP*₁ com quimioterápico e o único tempo avaliado foi 72 horas.

As análises se iniciaram na determinação de um protocolo dose-resposta da oxaliplatina que provocasse a neuropatia e que conseguisse reduzir ao mesmo tempo o tamanho do tumor sem debilitar o animal. Vários estudos serviram de base para pesquisar a neuropatia associada ao tratamento com a oxaliplatina, tais estudos do grupo LAFICA como PONTES (2009), PEREIRA et al (2018, 2019), trabalhavam com protocolos semelhantes, porém sem a variante do tumor.

A escolha da dose de OXL foi de 6 mg/kg, com o regime de tratamento consistindo em uma injeção a cada 48 horas durante 14 dias, totalizando 7 aplicações. Esse protocolo foi considerado adequado para induzir a neuropatia sensitiva periférica crônica por oxaliplatina, ao mesmo tempo em que minimiza os danos tóxicos aos animais, permitindo o estudo da progressão da neuropatia.

Em diversos estudos do grupo de pesquisa do LAFICA, (AZEVEDO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.* 2018, 2019 2020 e 2021) verificou-se que a dose de 2 mg/kg de oxaliplatina já induzia a neuropatia, porém, no presente estudo, o objetivo não era o de avaliar somente a neuropatia, mas também o desenvolvimento do tumor com a aplicação do tratamento combinado de *McLTP*₁ e oxaliplatina. A maioria dos modelos de estudo da neuropatia associada à quimioterapia do câncer testa os tratamentos de forma isolada e sem a indução do tumor (FLATTERS; DOUGHERTY; COLVIN, 2017).

Mesmo com a escolha de uma maior dose, a saúde do animal foi levada em consideração e, antes da escolha da dose de 6 mg /kg, foi feito 3 protocolos pilotos para verificação da dose - resposta que mais atendesse aos parâmetros do estudo. As doses de 4 e 8 mg /kg, apesar de induzirem a neuropatia, não atingiram a eficiência necessária para animais com tumor, pois na de 4 mg /kg a droga não alcançou efeito necessário de inibição fazendo, com que o tumores chegassem a medir 3,5 cm. Já a dose de 8 mg/kg provocava rapidamente a neuropatia e debilitava de forma muito rápida o animal que apresentava sinais clínicos anormais como alteração no seu comportamento, isolamento dos outros animais e sinais de mudanças fisiológicas como dor, pelagem arrepiada,

aumento da frequência cardíaca e foi observado também uma alteração no seu parâmetro biométrico com uma perda rápida de peso, forçando a aplicação do ponto final humanitário. Todas essas observações fizeram com que se chegasse à conclusão que essa dose não seria viável para os parâmetros éticos.

Para avaliar o efeito da $McLTP_1$ neste estudo, tomamos como base o trabalho realizado por Cesário (2023), que padronizou a dose-resposta em 4 mg/kg, a qual demonstrou a melhor atividade nociceptiva nos testes comportamentais táteis e térmicos. Cesário utilizou essa dose de $McLTP_1$ em um protocolo de administração diária, em associação com uma dose de oxaliplatina de 2 mg/kg (duas vezes por semana), com resultados eficazes.

No presente estudo, seguiu-se a mesma dose de $McLTP_1$, porém com uma dose maior de oxaliplatina, de 6 mg/kg, e uma frequência de administração muito mais elevada, a cada 48 horas, ao longo de 14 dias.

Com a dose de oxaliplatina estabelecida, foi necessário, em seguida fazer um ajuste na concentração de células inoculadas para a geração dos tumores. Portanto foram realizados dois protocolos experimentais, um de 7 dias e o outro de 14 dias, em ambos se utilizou a mesma quantidade de células para inoculação ($0,25 \times 10^5$ por animal), mas em concentrações diferentes. No experimento de 7 dias foi utilizado um volume de inoculação de 50 μ L, ou seja, a quantidade de $0,25 \times 10^5$ células estava concentrada em 50 μ L de salina. Neste experimento o crescimento tumoral mostrou-se muito agressivo, progredindo rapidamente, e alguns tumores apresentando ulcerações característicos de necrose. Foi verificado também que os animais, principalmente do grupo controle, debilitaram rapidamente e por esses dois motivos houve a necessidade de encerrar o experimento com 7 dias. Entretanto, foi possível mensurar o volume tumoral, coletar as amostras tumorais e o sangue periférico.

No experimento de 14 dias, optou-se por uma mudança no protocolo de inoculação. Utilizando-se um volume de 100 μ L, ou seja $0,25 \times 10^5$ células em 100 μ L de salina, o que resultou em um crescimento mais moderado do tumor, permitindo a extensão do experimento até o 14º dia.

Com a modificação do protocolo, os aspectos clínicos dos animais também foram melhorados, mantendo-os em um estado geral de saúde aceitável, com comportamento normal e sem alterações evidentes, o que sugere que o crescimento tumoral não causou muito desconforto. Isso foi um indicativo de que o protocolo utilizado foi bem tolerado, proporcionando um ambiente adequado para a realização do

estudo e garantindo a integridade dos dados experimentais.

Devido as variáveis comportamentais, optamos por usar camundongos machos ao invés de fêmeas. Como a neuropatia induzida por oxaliplatina, é frequentemente justificada pela influência das variáveis comportamentais e hormonais. Estudos mostram que os hormônios sexuais, especialmente os estrogênios e a progesterona, Mogil *et al.* (2000), podem alterar significativamente a resposta à dor e a outros comportamentos experimentais, o que pode introduzir variabilidade nos dados, visto que o intuito não era comparar o efeito diferenciado em machos e fêmeas.

Para mimetizar o que acontece na neuropatia sensitiva periférica, testes comportamentais foram realizados para verificar a presença de alodinia mecânica (teste Von frey) e térmica ao frio (teste da acetona) sintoma que aparece nos pacientes acometidos. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define alodinia como “Dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor” (REFERENCIA SITE IASP <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>). Assim, testes que avaliam alodínia devem levar em consideração estímulos inócuos mecânicos, como o toque leve ou estímulos térmicos inócuos como frio de 10° C para cima ou calor abaixo de 45° C. Assim, o teste de von Frey filamentos avalia a ocorrência de comportamento nociceptivo provocado pelo toque leve, que indica a presença de alodinia mecânica e o teste da acetona avalia o comportamento nociceptivo ao frio não nocivo (10°C) que indica a presença de alodínia térmica ao frio. O comportamento de retirada da pata aos filamentos de von Frey indica o limiar e quanto menor o limiar de sensibilidade, maior o grau da neuropatia instalada. A alodinia ao frio é avaliada através do tempo que o animal permanece com o comportamento nociceptivo após a aplicação da gota de acetona, onde quanto maior o tempo de reação, maior é a sensibilidade, indicando um maior grau de neuropatia.

A escolha entre a avaliação de alodínia térmica ao frio e não ao calor, faz referência às características da neuropatia associada à oxaliplatina, que em pacientes, aparecem sintomas como desconforto ao frio nos membros superiores, inferiores e região perioral (GODINHO *et al.*, 2020; ANDRE *et al* 2007), característica das fases aguda e crônica da neuropatia e as disestesias laringofaríngeas provocadas pelo frio, características da fase aguda da neuropatia. Ademais, em um estudo anterior, CESÁRIO (2023) demonstrou a participação de receptores TRPM8 na atividade antinociceptiva da *McLTP₁*. A literatura cita que estes receptores são transdutores de estímulos frios não nocivos estando presentes tanto em termorreceptores como nos nociceptores e são

participantes importantes na alodínia ao frio (PEIER *et al.*, 2002).

Em estudos experimentais, os camundongos tratados com oxaliplatina apresentam tanto alodinia mecânica quanto alodinia termica, principalmente ao frio (AZEVEDO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2018). Assim, no presente estudo verificou-se que a oxaliplatina induziu a NSP, pois os animais apresentaram tanto alodinia mecânica quanto térmica iniciando-se no 7º dia e permanecendo até o último dia de avaliação e que *McLTP*₁ preveniu o desenvolvimento dessa neuropatia, corroborando com CESÁRIO (2023).

Além dos testes comportamentais, este mesmo autor também demonstrou que a administração diária de *McLTP*₁ (4mg/kg) inibe a expressão C-Fos em gânglios da raiz dorsal. C-Fos é um marcador utilizado para avaliar a ativação neuronal. O aumento da sua expressão em locais específicos da via nociceptiva indica a ativação desta via e a diminuição da sua expressão indica analgesia (ZIMMERMANN, 1995; HARRIS, 1998; BULLITT *et al.*, 1992).

Outro marcador avaliado foi o ATF3 que está aumentado quando há injúria nervosa (BRAZ *et al.*, 2010; TSUJINO *et al.*, 2000). No referido estudo, observou-se que a oxaliplatina aumentou a expressão de ATF3 e que *McLTP*₁ preveniu esse aumento, permitindo sugerir que *McLTP*₁ tem efeito neuroprotetor além do efeito analgésico. Os dois efeitos juntos permitem concluir que *McLTP*₁ tem efeito anti-neuropático. No presente estudo, esses marcadores não foram avaliados. Entretanto, pelo fato de que a *McLTP*₁ inibiu tanto a alodínia mecânica como a alodínia térmica provocada por oxaliplatina (esta em uma dose 3 vezes mais alta do que a usada no trabalho de Cesario, 2023), podemos sugerir que o efeito anti-neuropático da *McLTP*₁ se manteve também com doses mais altas da oxaliplatina. Atualmente ainda não se tem prevenção nem tratamento para essa neuropatia e nossos resultados vêm corroborar o efeito neuroprotetor da *McLTP*₁.

Este estudo também avaliou o efeito da *McLTP*₁ e da combinação desta com a oxaliplatina sobre a cinética tumoral de células CT26.WT. A análise do crescimento tumoral é de fundamental importância para monitorar os efeitos dos tratamentos aplicados. Essa avaliação possibilita uma melhor compreensão do comportamento do crescimento tumoral e da eficácia das intervenções terapêuticas.

CT26 é um dos modelos de tumor de camundongo singênico mais amplamente usados. Castle *et al.*, 2014 fizeram a caracterização imunológica, genômica e transcriptômica do carcinoma colorretal CT26, mostrando que os padrões de

mutações em genes onco-relevantes, as assinaturas de expressão gênica e as vias reguladas em células CT26 estão de acordo com sua origem em epitélios de cólon e compartilham características com CCRs primários humanos. As mutações e perfis de expressão são semelhantes aos relatados para CCR humano esporádico, indiferenciado, refratário à terapia e propenso a metástase.

As células CT26 compartilham características moleculares com células de carcinoma colorretal humano agressivas, indiferenciadas e refratárias. Além disso, Sato *et al.* (2021), caracterizaram o tumor CT26 como um “tumor quente”, referindo-se a população imune do tumor, por apresentar uma grande quantidade de células imunes infiltrantes, e ser um bom modelo para desenvolver abordagens imunoterapêuticas.

A interação entre o tumor e o microambiente imune também desempenha um papel fundamental no comportamento de crescimento tumoral. A presença de células T reguladoras (Tregs) e de células M2 do tipo macrófagos é frequentemente observada no microambiente dos tumores CT26.WT, e esses componentes podem contribuir para a supressão da resposta imune antitumoral, facilitando o crescimento tumoral e a evasão imune (ALIMOHAMMADI *et al.*, 2021).

Os resultados observados no estudo, nos tratamentos com oxaliplatina, *McLTP*₁ e a combinação de ambos sugerem uma notável inibição do crescimento tumoral. Onde o grupo tratado somente com a oxaliplatina mostrou um significativo resultado de inibição do tumor, juntamente com o grupo *McLTP*₁ que também sozinha demonstrou inibição tumoral, um resultado inesperado, mas extremamente positivo, ao observarmos que a *McLTP*₁, quando administrada sozinha, teve um efeito antitumoral bastante satisfatório.

Este achado é particularmente significativo, pois sugere que a proteína *McLTP*₁ possui propriedades terapêuticas independentes, mostrando nesse estudo que ela conseguiu reduzir o tamanho do tumor. O fato de *McLTP*₁ sozinha ter demonstrado uma inibição indica que essa proteína tem uma atividade biológica que merece mais investigação.

Tais resultados podem correlacionar à expressão do marcador Ki67 que é comumente utilizado para avaliar a proliferação celular, pois sua expressão está diretamente relacionada à atividade proliferativa das células tumorais. Quanto maior a expressão de Ki67, maior a taxa de divisão celular (LI *et al.*, 2015).

A redução nos níveis de Ki67 observada nos grupos tratados com oxaliplatina, *McLTP*₁ e sua combinação indica que esses tratamentos conseguiram diminuir a

proliferação celular, sugerindo que eles foram eficazes em inibir o crescimento tumoral. Esse decréscimo no Ki67 é um indicativo de que as terapias ajudaram a bloquear a replicação das células tumorais, contribuindo para a redução do crescimento tumoral.

Quando relacionamos os resultados da cinética tumoral ao CD31 que é um marcador de células endoteliais que pode indicar a presença de angiogenese. A angiogênese é essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes às células tumorais. A redução desse marcador CD31 nos grupos tratados sugere que houve uma diminuição na angiogênese tumoral, o que é uma resposta favorável ao tratamento.

Angiogênese é um processo que envolve a formação de novos vasos sanguíneos devido ao desenvolvimento de capilares existentes e veias pós-capilares. É uma etapa normal e vital no crescimento e desenvolvimento, bem como uma reação que aparece na cicatrização de feridas e na formação de tecido de granulação. No entanto, também é importante na transição de tumores de um estado benigno para um estado maligno, salientando a importância do uso de inibidores de angiogênese no tratamento do câncer.

A angiogênese tumoral é um processo que inclui etapas como degradação da matriz endotelial vascular, migração de células endoteliais, proliferação de células endoteliais, formação de alças vasculares pela ramificação de células endoteliais e a formação de uma nova membrana basal. Observa-se uma estrutura e função neovascular do tecido tumoral anormal e uma matriz vascular incompleta, fazendo com que os microvasos sejam propensos a vazamentos. Essas características favorecem o tumor pois as células tumorais não precisam passar por um processo de invasão complicado e facilmente penetram diretamente na corrente sanguínea para gerar metástase. Estudos mostram que tumores benignos têm angiogênese esparsa e crescimento lento dos vasos sanguíneos, enquanto a maioria dos tumores malignos tem angiogênese intensiva, desorganizada e crescimento rápido. Portanto, a angiogênese desempenha um papel importante no desenvolvimento e na metástase de tumores, e é um marcador para a maioria dos tumores malignos (SARA & DAVID, 2011).

A oxaliplatina pode reduzir angiogênese tumoral ao causar danos no DNA e morte celular, como discutido por Ferreira (2006), que observaram que quimioterápicos podem reduzir a formação de novos vasos sanguíneos em tumores. Além disso, a *McLTP₁* pode exercer efeitos anti-angiogênicos, possivelmente pela redução da inflamação ou pela modulação de fatores como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular).

No presente estudo, através da marcação de CD31 no tecido tumoral, pudemos

mostrar que a ausência de tratamento, como no grupo controle, provoca um aumento marcante da angiogênese, com um aparente padrão desordenado da formação de vasos sanguíneos. O tratamento com oxaliplatina diminuiu acentuadamente essa marcação, assim como observamos também uma mudança de padrão na disposição dos vasos formados, com aspecto mais linear e menos bifurcações. Esse padrão também foi observado nos grupos tratados com a *McLTP*₁ e com a combinação de ambos. A *McLTP*₁ não alterou o efeito da oxaliplatina na redução de CD31 nos tumores avaliados.

Quando comparamos os efeitos *in vivo* da *McLTP*₁ e da sua combinação com a oxaliplatina, observamos efeitos similares e contrários na avaliação, *in vitro*. Tanto *in vivo* quanto *in vitro* a *McLTP*₁ mostrou efeito inibitório, inibindo o crescimento tumoral e a também a viabilidade celular da CT26.WT *in vitro*. O efeito *in vitro* foi aumentado com relação ao tempo de incubação. Observou-se uma diminuição da IC₅₀ da *McLTP*₁ à medida que o tempo de incubação foi estendido. Entretanto o efeito *in vivo* da combinação da *McLTP*₁ com a oxaliplatina obteve efeitos diferentes do resultado *in vitro*. *In vivo*, a *McLTP*₁ não foi capaz de modificar o efeito antitumoral da oxaliplatina, onde se observou que o volume tumoral, peso e marcadores de progressão tumoral como Ki67 e CD31 não foram alterados quando comparamos o grupo da oxaliplatina com o grupo do tratamento combinado. Contudo, o experimento *in vitro* mostrou um resultado diferente, onde a *McLTP*₁ potencializou o efeito citotóxico da oxaliplatina após 72 horas de incubação, com efeito mais pronunciado em 96 horas, em que a IC₅₀ baixou em cerca de 50%.

Ao relacionar os resultados da cinética tumoral com a expressão do HMGB1 foi verificado que a oxaliplatina diminuiu o volume tumoral e aumentou os níveis de HMGB1, uma proteína associada à resposta ao dano celular e à inflamação.

A proteína HMGB1 é associada à cromatina não histona, amplamente distribuída em células eucarióticas, e está envolvida no reparo de danos ao DNA e na manutenção da estabilidade genômica. Além disso, desempenha um papel importante na resposta imunológica e na regulação de processos inflamatórios. Durante a morte celular, especialmente a necrose, o HMGB1 é liberado das células e atua como uma molécula sinalizadora que ativa o sistema imunológico, promovendo inflamação e recrutamento de células imunes para o local da lesão (WANG, 2020). Em tumores o HMGB1 é liberado pela célula tumoral durante o processo de necrose, evento importante no mecanismo de morte celular imunogênica (HATO et al 2014).

A oxaliplatina possui mecanismo antitumoral dependente, pelo mesmo em parte, da morte celular imunogênica um processo que está diretamente relacionado à liberação da proteína HMGB1 pelo tumor. A oxaliplatina através do seu mecanismo citotóxico, provoca danos no DNA celular, resultando na exposição de calreticulina, ATP e na liberação do HMGB1 no espaço extracelular. Esse, por sua vez, por ligação ao TLR4 ativa células dendríticas a expressar o MHC classe I e apresentação do antígenos tumorais aos linfócitos T. Isso resulta na maturação de linfócitos T para o reconhecimento dos antígenos tumorais e ativação das células citotóxicas (HATO, 2014). Assim, o aumento da expressão de HMGB1 nos tumores tratados com oxaliplatina corrobora com esses dados da literatura.

Os resultados aqui apresentados mostram que a *McLTP*₁ também aumentou a marcação para HMGB1 nos tumores avaliados, o que leva a uma suspeita de que essa proteína possa estar causando a morte tumoral por mecanismos homólogos aos da oxaliplatina, ou de fármacos que induzem morte celular imunogênica. De fato, a *McLTP*₁ mostrou uma atividade citotóxica direta, *in vitro*, nas células CT26.WT o que também poderia estar ocorrendo no tumor nos camundongos tratados com essa proteína. Adicionalmente a *McLTP*₁ também causou o aumento da marcação de HMGB1 quando combinada a oxaliplatina, demonstrando uma potenciação do efeito da oxaliplatina sobre este marcador. Em termo de mecanismo esse incremento na liberação de HMGB1 deveria causar uma potenciação do efeito da oxaliplatina resultando na diminuição do volume tumoral. Entretanto os resultados de avaliação do tamanho dos tumores não mostrou isso.

Nos resultados da leucometria total e diferenciada observamos que a oxaliplatina provocou uma redução significativa nos grupos dos leucócitos e monócitos, tanto com 7 dias, como com 14 dias de tratamento. São poucos os estudos documentando as alterações imunológicas no baço, timo e medula óssea após o tratamento com oxaliplatina; especificamente, há uma escassez de estudos sobre o impacto do tratamento com oxaliplatina na hematopoiese. A toxicidade hematológica oxaliplatina no que diz respeito às células imunes ainda é controversa e parece ser dependente da dose e duração do tratamento. Por exemplo, Stojanovska *et al.*, 2019 mostrou que a oxaliplatina aumentou a resposta imune em camundongos BALB/c, em que foi utilizada uma dose de 3 mg/kg, por via intraperitoneal (3 vezes por semana por 14 dias), com dose cumulativa de 18 mg/kg) e os animais não eram portadores de tumor. Outro estudo avaliando a toxicidade hematológica da oxaliplatina em que camundongos tratados com

oxaliplatina 2.5mg/kg por 4 dias consecutivos, durante 3 semanas (dose cumulativa de 30mg/kg) mostrou um resultado diferente, onde houve uma diminuição da contagem total de leucócitos em sangue periférico e o desenvolvimento de anemia. A avaliação por citometria do baço evidenciou uma redução de leucócitos com destaque para linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, além da esplenomegalia (LEES *et al.*, 2020). No presente estudo, a dose cumulativa de oxaliplatina foi 42 mg/kg, o que levou a uma redução total dos leucócitos com enfoque em linfócitos e monócitos, sem alterar neutrófilos. ITO *et al.*, (2018) observou resultados semelhantes em ratos.

A administração diária da *McLTP1* preveniu a leucopenia causada pela oxaliplatina, revertendo quase que totalmente a diminuição na contagem dessas células nos animais tratados com oxaliplatina. A prevenção da leucopenia pode ser desejável no tratamento do câncer, visto que o sistema imunológico desempenha um papel importante no controle da progressão tumoral, assim como a morte celular imunogênica é um mecanismo importante no efeito antineoplásico da oxaliplatina e tem uma participação importante dos linfócitos.

Curiosamente a *McLTP1* quando administrada como monoterapia aumentou a contagem total de leucócitos com destaque para linfócitos em 7 dias e 14 dias e um aumento transitório em neutrófilos com 7 dias de tratamento. Isso sugere um efeito imunostimulante da *McLTP1* que seria desejável no tratamento do câncer como comentado acima. Estudos adicionais deve ser realizados para entender o mecanismo dessa regulação imune que repercutiu no sangue periférico.

Outro aspecto importante diz respeito a avaliação do aspecto clínico dos animais e a análise ponderal. Tendo em vista que os animais desse grupo estavam com um aspecto clínico muito bom, animais com atividade exploratória, ganho de peso, pelagem normal, sem sinais de dor ou sofrimento, indica que de alguma forma a *McLTP1* estaria causando um bem nos animais. Possivelmente através do seu efeito neuroprotetor, diminuindo os sintomas neuropáticos que envolvem dor e desconforto, assim como pelo seu efeito imunomodulador. De fato, foi observado que a oxaliplatina promove uma diminuição no ganho ponderal e que a *McLTP1* reduziu esse efeito. Além disso o grupo tratado somente com *McLTP1* foi o único grupo a ter ganho de peso, mostrando-se diferente dos demais grupos. O fato de a *McLTP1* prevenir a leucopenia induzida por oxaliplatina pode estar relacionada nesse aspecto geral do animal observado nos grupos tratados com a proteína.

Por fim, os resultados obtidos neste projeto destacam de forma notável o

potencial terapêutico da proteína *McLTP₁*. Esta proteína demonstrou propriedades antinociceptivas significativas, prevenindo a neuropatia induzida pela oxaliplatina, um efeito frequentemente debilitante no tratamento oncológicos com esse quimioterápico. Além disso, *McLTP₁* apresentou ação antitumoral, sem interferir no impacto da oxaliplatina, mantendo sua eficácia terapêutica. A proteína também desempenhou um papel fundamental na prevenção da linfopenia, um efeito adverso comum na quimioterapia, promovendo, assim, uma melhor resposta imunológica o que pode ter contribuído também para o bem-estar geral dos animais, que não apresentaram sinais de debilidade ou perda de peso. *McLTP₁* mostrou um efeito citotóxico *in vitro* e também um efeito potencializador na ação da oxaliplatina ponto que deve ser explorado em estudos futuros. Outro aspecto extremamente vantajoso é que os efeitos *in vivo* da *McLTP₁* foram obtidos pela administração oral, o que, futuramente, tornaria o tratamento mais acessível e bem aceito pelos pacientes, conferindo uma vantagem significativa em termos de praticidade e adesão ao tratamento. Todos esses aspectos em conjunto apontam para o grande potencial terapêutico da *McLTP₁* como um adjuvante promissor no tratamento do câncer colorretal.

8 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que a *McLTP*₁: (1) inibiu a alodinia mecânica e térmica induzida por oxaliplatina em camundongos com tumor de células CT26.WT, mostrando um efeito antinociceptivo; (2) mostrou também um efeito antitumoral, *in vivo* e efeito citotóxico *in vitro*, com a diminuição da marcação para Ki67 e CD31 em tecido tumoral; (3) adicionalmente, a *McLTP*₁ não interferiu no efeito antitumoral da oxaliplatina *in vivo*, mas *in vitro* promoveu uma potenciação do seu efeito citotóxico nas células CT26.WT; (4) aumentou a marcação de HMGB1 em tecido tumoral e potenciou o efeito da oxaliplatina sobre este marcador e por último (5) preveniu a leucopenia provocada pela oxaliplatina principalmente em linfócitos.

9 REFERÊNCIAS

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.

ANDRE, T. *et al.* **CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer.** *Eur J Cancer*, 35: 1343-7, 1999.

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

ARETI APARNA, VEERA GANESH YERRA, VGM NAIDU, ASHUTOSH KUMAR, (2014) **Oxidative Stress And Nerve Damage: Role In Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy, Redox Biology**, Volume 2, , Pages 289-295, Issn 2213-2317.

ARANGO, D. *et al.* **Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells.** *British Journal of Cancer*, 91(11), 1931 – 1946, 2004.

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.

ALIMOHAMMADI R, MAHMOODI CHALBATANI G, ALIMOHAMMADI M, GHAFFARI-NAZARI H, RAHIMI A, MORTAZ E, MOSSAFA N, BOON L, JALALI SA. **Dual blockage of both PD-L1 and CD47 enhances the therapeutic effect of oxaliplatin and FOLFOX in CT-26 mice tumor model.** *Sci Rep.* 2023 Feb 11;13(1):2472. doi: 10.1038/s41598-023-29363-9. PMID: 36774400; PMCID: PMC9922272.

AL-SOHAILY S, BIANKIN A, LEONG R, KOHONEN-CORISH M, WARUSAVITARNE J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(9):1423-1431. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07200.x

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.

BLOEM, L.T. *et al.* **Factors impacting treatment choice in the first-line treatment of colorectal cancer.** *Oncol Ther*, 4: 103–16, 2016.

BRANCA, J. J. V. *et al.* **Oxaliplatin-induced blood brain barrier loosening: a new point of view on chemotherapy-induced neurotoxicity.** *Oncotarget*, Vol. 9, (No. 34), pp: 23426-23438, 2018.

BRAUN, M. S. *et al.* **Balancing the efficacy and toxicity of chemotherapy in colorectal cancer.** *Ther Adv Med Oncol*, 3: 43–52, 2011.

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

BRÁZ, JOÃO M.; BASBAUM, ALLAN I. **Differential ATF3 expression in dorsal root ganglion neurons reveals the profile of primary afferents engaged by diverse noxious chemical stimuli.** *Pain* 150(2):p 290-301, August 2010.

BULLITT E, LEE CL, LIGHT AR, WILLCOCKSON H (1992) **The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced c-fos expression in the rodent spinal cord.** *Brain Res* 580:172–179. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90941-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90941-2).

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.

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.

CASTLE JC, LOEWER M, BOEGEL S, DE GRAAF J, BENDER C, TADMOR AD, BOISGUERIN V, BUKUR T, SORN P, PARET C, DIKEN M, KREITER S, TÜRECI Ö, SAHIN U. **Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma.** *BMC Genomics*. 2014 Mar 13;15(1):190. doi: 10.1186/1471-2164-15-190. PMID: 24621249; PMCID: PMC4007559.

CESARIO, FRAS: **Efeito neuroprotetor de uma proteína isolada de sementes de Morinda citrifolia (noni) na neuropatia sensitiva periférica induzida por oxaliplatina em camundongos**, Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Farmacologia da Universidade Estadual do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia. 2013.

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

COSTA, A.S: **Mecanismos de ação do efeito antinociceptivo e avaliação da toxicidade *in vitro* de mcltp1, uma proteína isolada de sementes de morinda citrifolia I.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, 2021.

CHENG F, ZHANG R, SUN C, RAN Q, ZHANG C, SHEN C, YAO Z, WANG M, SONG L AND PENG C (2023), Oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity in colorectal cancer patients: mechanisms, pharmacokinetics and strategies. *Front. Pharmacol.* 14:1231401. doi: 10.3389/fphar.2023.1231401

DE JONG, Mechteld C, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment. *Journal of Clinical Oncology*, 2011, vol. 29, no. 23, p. 3140-5

DE GRAMONT, A. *et al.* **Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.** *J Clin Oncol*, 18:2938-47, 2000.

DO CARMO LD, DE FÁTIMA PINHEIRO RANGEL G, RABELO LMA, 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.* 2022;395(9):1097-1107. doi:10.1007/s00210-022-02267-7

DYSON JK, RUTTER MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk?. *World J Gastroenterol.* 2012;18(29):3839-3848.

doi:10.3748/wjg.v18.i29.3839

DOUILLARD, J. Y. *et al.* **Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial.** *Lancet*, 355(9209):1041-7, 2000.

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.

DVORAK, H. F. (1986). **Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.** *N. Eng. J. Med.*, 315, 1650-1659.

DVORAK, H.F.; DETMAR, M.; CLAFFEY, K.P.; NAGY, J.A.; Van de WATER, L. & SENGER, D.R. (1995) **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignants and inflammation.** *Int. Arch. Allergy and Immunol.* 107, 233-235.

ENG CATHY, TAKAYUKI YOSHINO, ERIKA RUÍZ-GARCÍA, NERMEEN MOSTAFA, CHRISTOPHER G CANN, BRITTANY O'BRIAN, AMALA BENNY, RODRIGO O PEREZ, CHIARA CREMOLINI **Colorectal cancer** *Lancet* 2024; 404: 294–310 Published Online June 20, 2024 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00360-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00360-X)

ENGSTROM, P. F. *et al.* **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer.** *J Natl Compr Canc Netw*, 7:778-831, 2009.

FINKINA, E. I. *et al.* **Lipid transfer proteins as components of the plant innate immune system: structure, functions, and applications.** *Acta Naturae*, v. 8, n. 2, p. 47-61, 2016.

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.

FREDDIE, B. *et al.* **Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA Cancer J Clin*, 74:229–263, 2024.

FUIJE, Y. *et al.* **Oxaliplatin, a Potent Inhibitor of Survivin, Enhances Paclitaxel-induced Apoptosis and Mitotic Catastrophe in Colon Cancer Cells.** *Jpn J Clin Oncol*, 35(8), 2005.

GALLOIS, C. *et al.* **Efficacy of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in older patients with stage III colon cancer: An ACCENT/IDEA pooled analysis of 12 trials.** *Annals of Oncology, Abstracts Volume 33, Issue S7, 2022.*

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.*

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.*

GROTNEY, 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.*

GROLLEAU, F. *et al.* **A Possible Explanation for a Neurotoxic Effect of the Anticancer Agent Oxaliplatin on Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels.** *Journal of Neurophysiology, v. 85, n. 5, p. 2293-2297, maio de 2001.*

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.*

HARRIS, J. A. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Research Bulletin, v. 45, n. 1, p. 1-8, 1998.*

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.*

HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M.S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A.T. & DE BRUIJN, E.A. (2004). **Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.** *Pharmacol Rev., 56(4), 549-80.*

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.*

JAIN, R. K. (2003). **Molecular regulation of vessel maturation.** *Nat. Med., 9, 685-693.*

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

KIM, W. **Effect of Oxaliplatin on Voltage-Gated Sodium Channels in Peripheral Neuropathic Pain.** Processes, 8, 680, 2020.

KUMAR, H. C. *et al.* **Efficacy and Safety of Morinda citrifolia L. (Noni) as a Potential Anticancer Agent.** Integrative Cancer Therapies, 21, 1-20, 2022.

KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; SCHOEN, F.J. **Robbins – Patologia estrutural e funcional.** Ed. Elsevier. 7a ed, 2005.

LEES JG, WHITE D, KEATING BA, BARKL-LUKE ME, MAKKER PGS, GOLDSTEIN D, MOALEM-TAYLOR G. **Oxaliplatin-induced haematological toxicity and splenomegaly in mice.** PLoS One. 2020 Sep 2;15(9):e0238164.

LI, L. T., JIANG, G., CHEN, Q., & ZHENG, J. N. (2015). **Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer.** Molecular medicine reports, 11(3), 1566-1572.

LIN, T., HU, L., HU, F., LI, K., WANG, C. Y., ZONG, L. J., ET AL. (2022). NET-triggered NLRP3 activation and IL18 release drive oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. Cancer Immunol. Res. 10 (12), 1542–1558. doi:10.1158/2326-6066. CIR-22-0197

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.

LUO, ZW., ZHU, MG., ZHANG, ZQ. *et al.* (2019) **Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis.** BMC Cancer 19, 123

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.

MAIA, D.F.S: **Farmacoepidemiologia de terapia molecular oncológica em clínicas privadas da cidade de Fortaleza, Ceará**, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, 2020.

MINISTERIO DA SAÚDE: Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas de adenocarcinoma de colón e reto de 2024.

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.

MARTIN LGR, SILVA MDP. Chemotherapy induced peripheral neuropathy: a literature review. Einstein. 2011;9(4 Pt 1):538-44.

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.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Boas práticas de farmacovigilância para as Américas**. Washington, D.C.: OPAS; 2011.

OUN, R. *et al.* **The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists**. Dalton Trans, 47, 6645–6653, 2018.

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.

PEREIRA AF, DE OLIVEIRA FFB, DE FREITAS ALVES BW, DE MENEZES KLS, DE MESQUITA AKV, LISBOA MRP, DE SOUSA KKO, VALE ML. **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. 2018 Feb 1;340:77-84. doi: 10.1016/j.taap.2018.01.001. Epub 2018 Jan 4. PMID: 29307816.

PEREIRA AF, LISBOA MRP, DE FREITAS ALVES BW, DA SILVA CMP, DIAS DBS, DE MENEZES KLS, CESÁRIO FRAS, DE FRANÇA JC, DE OLIVEIRA AR, HALLAK JEC, ZUARDI AW, CRIPPA JA, DE ALENCAR NMN, LIMA-JÚNIOR RCP, VALE ML. **Endocannabinoid System Attenuates Oxaliplatin-Induced Peripheral Sensory Neuropathy Through the Activation of CB1 Receptors**.

Neurotox Res. 2021 Nov 18. doi: 10.1007/s12640-021-00442-x. Epub ahead of print. PMID: 34792764.

ITO, YUKAKO, SHINJI KOBUCHI, RISA SHIMIZU, AND YOSUKE KATSUYAMA. "**Pharmacokinetic and toxicodynamic evaluation of oxaliplatin-induced neuropathy and hematological toxicity in rats.**" *Cancer chemotherapy and pharmacology* 81 (2018): 155-161.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2022 - 2025: incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2023.

PEREIRA AF, LINO JA, ALVES BWF, LISBOA MRP, PONTES RB, LEITE CAVG, NOGUEIRA RB, LIMA-JÚNIOR RCP, VALE ML. Amifostine protects from the peripheral sensory neuropathy induced by oxaliplatin in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2020 Sep 18;53(11):e10263.

PEIER, ANDREA M., AZIZ MOQRICH, ANNE C. HERGARDEN, ALISON J. REEVE, DAVID A. ANDERSSON, GINA M. STORY, TARYN J. EARLEY *ET AL.* "A TRP channel that senses cold stimuli and menthol." *Cell* 108, no. 5 (2002): 705-715.

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.

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.

RISAU, W. (1997). **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature*, 386, 671-674.

RMALI, KHALED A., M. C. A. PUNTIS, AND W. G. JIANG. (2007) "**Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer.**" *Colorectal disease* 9.1: 3-14.

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.

SALES, F.J.L: **Valor prognóstico da expressão de hmgb1 e il-33 em câncer de mama triplo negativo,** Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará,2023.

SALMINEN, T. A.; BLOMQUIST, K.; EDQVIST, J. **Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function.** *Planta*, v. 244, n. 5, p. 971-997, 2016.

SAMPAIO, T.B. et al. 2023. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neural Regen Res* 12, 549-557.

SAMPAIO, J.P.A: Imunoexpressão de caderina-e no câncer colorretal primário e nas metástases linfonodais, Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará,2013.

SOUZA AA, COSTA AS, CAMPOS DCO, 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*. 2018;149:9-17. doi:10.1016/j.biochi.2018.03.011

SANTOS, M. O. *et al.* **Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, 69(1), e-213700, 2023.

SARA M W., DAVID A C., (2011) **Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets.** *Nature Medicine* 17: 1359-1370.

SATO, Y., FU, Y., LIU, H. *et al.* Tumor-immune profiling of CT-26 and Colon 26 syngeneic mouse models reveals mechanism of anti-PD-1 response. *BMC Cancer* 21, 1222 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08974-380>

SEKIGUCHI, F. *et al.* **Role of HMGB1 in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy.** *Int. J. Mol. Sci*, 22, 367, 2021.

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.

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

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.

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.

STOJANOVSKA V, PRAKASH M, MCQUADE R, FRASER S, APOSTOLOPOULOS V, SAKKAL S, NURGALI K. (2019) **Oxaliplatin Treatment Alters Systemic Immune Responses.** *Biomed Res Int*. Feb 18;2019:4650695.

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.

SULLIVAN, B. A. *et al.* **Cause, Epidemiology, and Histology of Polyps and Pathways to Colorectal Cancer.** *Gastrointest Endoscopy Clin N Am*, 32, 177–194, 2022.

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*, 71(3):209-49, 2020.

SUTTON, E. C. *et al.* **Early nucleolar responses differentiate mechanisms of cell death induced by oxaliplatin and cisplatin.** *J. Biol. Chem*, 296 100633, 2021.

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.

TSUJINO H, KONDO E, FUKUOKA T, et al (2000) **Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury.** *Mol Cell Neurosci* 15:170–182.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, **National Institutes of Health, National Cancer Institute.** Common terminology criteria for adverse events (CTCAE) version 4.0, 4(03), 2010.

VERY, NINON & LEFEBVRE, TONY & EL YAZIDI-BELKOURA, IKRAM. (2017). **Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer.** *Oncotarget*. 9. 10.18632/oncotarget.22377.

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.

WANG S, ZHANG Y. **HMGB1 in inflammation and cancer.** *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):116. Published 2020 Aug 24. doi:10.1186/s13045-020-00950-x.

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.

ZHOU J, XU B, HUANG J, JIA X, XUE J, SHI X ET AL. **¹H NMR-based metabonomic and pattern recognition analysis for detection of oral squamous cell carcinoma.** *Clin Chim Acta*. 2009; 401(1-2): 8-13.

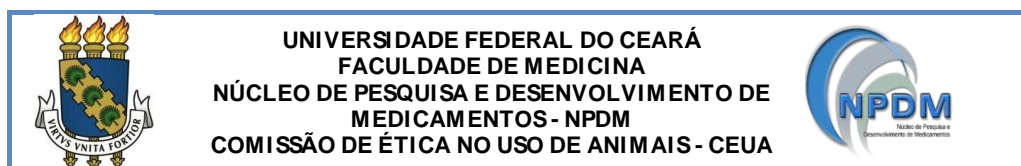
ZUO, J. *et al.* **Overexpression of CXCR4 promotes invasion and migration of non-small cell lung cancer via EGFR and MMP - 9.** *Oncology Letters*. v.14, n. 6, p. 7513–7521, 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.7168.

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.

ZHENG H, XIAO WH, BENNETT GJ. (2011) **Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy.** *Exp Neurol*. 2011 Dec;232(2):154-61. Epub 2011 Aug 30.

ZIMMERMANN, M. **Immediate early genes (IEGs) encoding for inducible transcription factors (ITFs) and neuropeptides in the nervous system: functional network for long-term plasticity and pain.** *Progress in Brain Research*, v. 104, p. 299–321, 1995.

ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA NPDM




CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Efeito da proteína McLTP1 na atividade antitumoral da oxaliplatina e na neuropatia sensitiva periférica associada em camundongos BALB/c com tumor de células** registrada com o protocolo 20090522-0, sob a responsabilidade de **MARIANA LIMA VALE** e **BRENO LEONARDO DA SILVA** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 22/06/2023.

We hereby certify that the project entitled **Effect of McLTP1 protein on the antitumor activity of oxaliplatin and associated peripheral sensory neuropathy in BALB/c mice with cell tumor** identified by the protocol number 20090522-0, and conducted by responsibility **MARIANA LIMA VALE** and **BRENO LEONARDO DA SILVA** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 22/06/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01/07/2022 Fim: 01/07/2024
Espécie	camundongo
Linhagem	BALB/c
Nº de animais autorizados	96
Peso	20 a 25 gramas
Idade	4 a 5 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Documento assinado digitalmente
 MARISA JADNA SILVA FREDERICO CANUTO
 Data: 01/09/2023 15:04:22-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fortaleza, 31 de agosto de 2023

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
 Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
 Universidade Federal do Ceará

ANEXO II – CERTIFICADO DE ANÁLISE DA LINHAGEM DE CÉLULAS CT26.WT



CERTIFICATE OF ANALYSIS

ATCC® Number: CRL-2638™
Lot Number: 70037080

Name: CT26.WT
Description: Colon Carcinoma
Species: Mouse (*Mus musculus*)
Volume/Ampule: Approximately 1 mL
Date Frozen: 07AUG2020
Recovery: A T-25 setup at a seeding density of 2.0×10^4 viable cells/cm² reaches approximately 30% confluence in 1 day and 80% confluence in 3 days.
Product Format: Cells cryopreserved in the appropriate cryopreservation medium
Expiration Date: Not applicable
Storage Conditions: Vapor phase of liquid nitrogen

Test / Method	Specification	Result
Ampule passage number	Report results	Unknown
Population doubling level (PDL)	Report results	Not applicable
Total cells/ampule (Cell count using Trypan Blue stain method)	Report results	9.8×10^5 total cells/ampule
Post-freeze viability (Cell count using Trypan Blue stain method)	≥ 50.0%	88.9%
Growth properties (Visual observation method)	Adherent	Adherent
Morphology (Visual observation method)	Fibroblast-like*	Fibroblast-like
Test for mycoplasma contamination Hoechst DNA stain (indirect) method Agar culture (direct) method PCR-based assay	None detected None detected None detected	None detected None detected None detected
Species determination: COI assay (interspecies)	Mouse	Mouse
Sterility test (BacT/ALERT 3D) iAST bottle (aerobic) at 32.5°C iNST bottle (anaerobic) at 32.5°C	No growth No growth	No growth No growth

* Fibroblast-like: Any adherent cells of a spindle or stellate shape.

ATCC
 10801 University Boulevard
 Manassas, VA 20110-2209 USA
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-365-2700
 Fax: 703-365-2750
 E-mail: tech@atcc.org
 or contact your local distributor

- Page 1 of 2 -

Template Doc ID: 31194

Template Revision: 6

Template Effective Date: 02/21/2020