

## O PAPEL DO ENVELHECIMENTO NA DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA PELA OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS

ANGÉLICA S. REIS<sup>1</sup>; JAINI J. PALTIAN<sup>2</sup>; WILLIAM B. DOMINGUES<sup>3</sup>;  
VINICIUS F. CAMPOS<sup>4</sup>; CRISTIANE LUCHESE<sup>5</sup>; ETHEL A. WILHELM<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – ge\_schiavon@hotmail.com <sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – jaini\_paltian@hotmail.com <sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – williamwww@yahoo.com.br <sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com <sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – cristiane\_luchese@yahoo.com.br (coorientadora) <sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br (orientadora)

### 1. INTRODUÇÃO

A neuropatia periférica é o principal efeito adverso causado por inúmeros fármacos quimioterápicos e a principal causa de dor em sobreviventes do câncer (NICHETTI et al., 2019). Atualmente o câncer é a segunda causa de morte no mundo, sendo que a dor é o sintoma mais comum, temido e oneroso presente em pacientes oncológicos. Somando-se a isso, o envelhecimento populacional é um fenômeno mundial que impõe grandes desafios e demanda a implementação de políticas públicas específicas (BEARD et al., 2016). Segundo a organização mundial da saúde, até 2025, o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos. Nesse contexto, estudos têm demonstrado que as doenças oncológicas têm sido muito mais recorrentes em idosos uma vez que estão relacionadas ao envelhecimento das células e à falta de proteção hormonal.

O câncer de colorretal é o terceiro em incidência, em ambos os sexos, e a principal causa de morte por câncer em mulheres (FITZMAURICE et al., 2017). A oxaliplatina (OXA) é um fármaco quimioterápico, derivado da platina, amplamente prescrito para o tratamento do câncer de colorretal (NICHETTI et al., 2019). Assim como outros compostos derivados da platina, o tratamento com OXA induz efeitos adversos que incluem mielotoxicidade e neuropatia periférica.

A neuropatia periférica induzida pelo tratamento com OXA é a principal toxicidade limitante da dose, uma vez que causa severa queda na qualidade de vida dos pacientes e conduz a descontinuação do tratamento (NICHETTI et al., 2019; STAROBOVA; VETTER, 2017). Os efeitos neurotóxicos induzidos pela OXA incluem inicialmente o desenvolvimento de uma neuropatia aguda, enquanto que, a exposição continuada pode levar ao desenvolvimento de neuropatia periférica crônica. As neuropatias aguda e crônica ocorrem em 90% e 70% dos pacientes, respectivamente (STAROBOVA; VETTER, 2017). Pacientes com neuropatia periférica experimentam sintomas de dor neuropática, que é definida como a dor causada por lesão ou doença no sistema nervoso somatosensorial (FLATTERS et al., 2017). De acordo com NICHETTI et al. (2019) a dor neuropática pode ser mais prevalente no tratamento com a OXA que com outros quimioterápicos, uma vez que a OXA apresenta um perfil sintomático mais complexo.

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel do envelhecimento na dor neuropática induzida pelo tratamento com a OXA, a fim de elucidar diferentes mecanismos envolvidos e buscar novos alvos farmacológicos para o desenvolvimento de terapias inovadoras.

### 2. METODOLOGIA

Este estudo foi desenvolvido com camundongos machos, jovens (2 meses) e velhos (20 meses), da raça Swiss. Todos os experimentos foram conduzidos de

acordo com as normas preconizadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEAA 4506-2017).

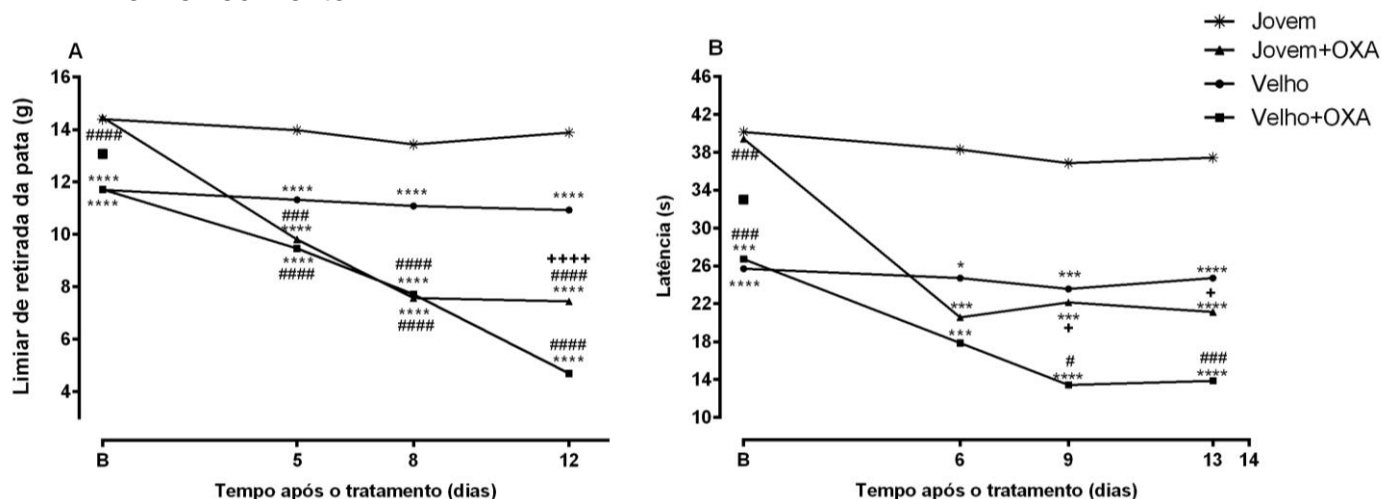
De acordo com o protocolo experimental, nos dias 0 e 2, os camundongos receberam OXA (10 mg/kg) ou soro glicosado (10 ml/kg) por via intraperitoneal. Posteriormente, a medida das sensibilidades mecânica e térmica foram avaliadas com a finalidade de determinar o limiar de dor induzido pelo tratamento com a OXA em camundongos jovens e velhos. Nos dias 0, 5, 8 e 12 a sensibilidade mecânica dos animais foi medida com um analgesímetro digital. Este teste consiste em evocar um reflexo de flexão da pata traseira com um transdutor de força portátil. O limiar de retirada da pata foi medido aplicando-se uma ponta de polipropileno perpendicular à superfície plantar da pata traseira do animal, com uma pressão progressiva e constante até a retirada da pata, o valor da força foi registrado automaticamente (de SANTANA et al., 2013).

Por sua vez, a sensibilidade térmica foi avaliada através do teste da placa quente, nos dias 0, 6, 9, e 13, como descrito por WOOLFE E MACDONALD (1944), com algumas modificações. O teste da placa quente é utilizado há vários anos com o objetivo de avaliar a nocicepção de origem não inflamatória (WOOLFE E MACDONALD, 1944). Nesse sentido, os animais foram colocados em uma caixa de plástico sobre uma placa de metal aquecida a  $52 \pm 1$  °C. O tempo de latência das respostas nociceptivas, como lambes ou sacudir uma das patas ou saltar, foi registrado como reação. Para evitar danos às patas dos animais, o tempo de permanência na placa foi limitado a 45 s.

Após os testes comportamentais, no dia 15 do protocolo experimental, os animais foram submetidos à eutanásia. As amostras de córtex cerebral foram coletadas para análises bioquímicas e para quantificar os níveis de expressão gênica pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

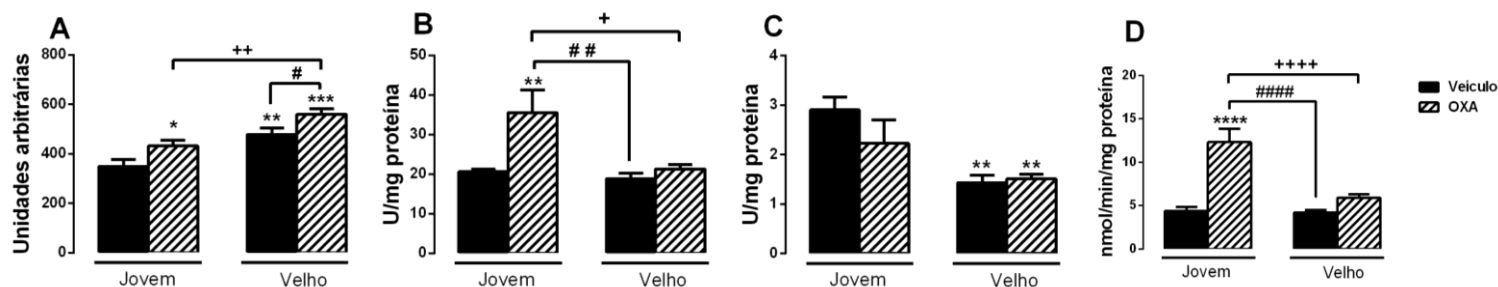
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento com a OXA causou hipersensibilidade mecânica e térmica tanto em camundongos jovens quanto velhos, como demonstrado na Figura 1A-B. Entretanto, destaca-se que os animais velhos, no final do protocolo, apresentaram maior hipersensibilidade mecânica e térmica quando comparado ao grupo Jovem+OXA. Motivado pelos resultados dos testes comportamentais, foram realizadas as análises *ex-vivo* com o objetivo de ampliar a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor neuropática induzida pela OXA, bem como, para avaliar as peculiaridades desta neuropatia relacionadas ao envelhecimento.

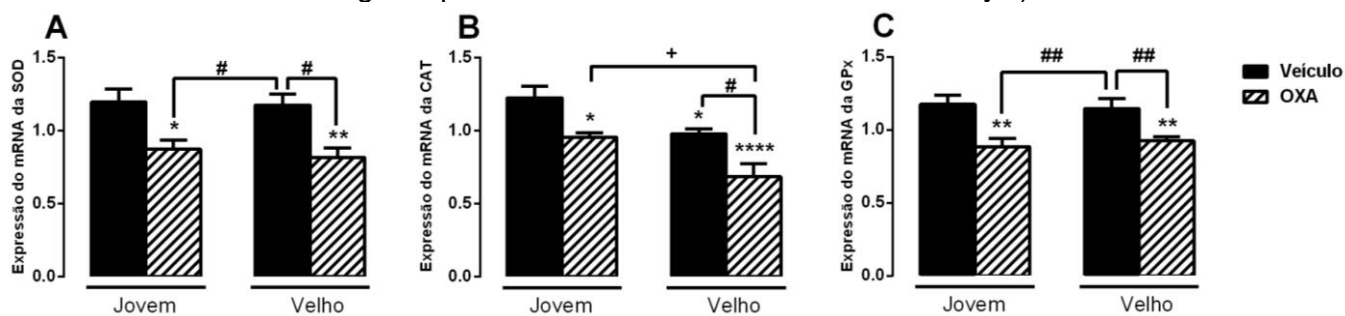


**Figura 1.** Efeito da OXA nas sensibilidades (A) mecânica e (B) térmica, em camundongos jovens e velhos. (\*)  $P < 0,05$ , (\*\*\*)  $P < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo Jovem; (#)  $P < 0,05$ , (###)  $P < 0,001$  e (####)  $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo Velho; (+)  $P < 0,05$  e (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo Velho+OXA (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey's).

O tratamento com a OXA causou um aumento nos níveis de espécies reativas (ER) no córtex cerebral dos camundongos. E, novamente os animais velhos foram mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da OXA, visto que, o grupo Velho+OXA apresentou um nível mais elevado de ER quando comparado ao grupo Jovem+OXA (Figura 2A). Ainda, observou-se que o fator idade influenciou nos níveis de ER nos animais não expostos à OXA, uma vez que os animais velhos exibiram níveis mais elevados de ER quando comparado aos jovens. Diante dos resultados obtidos, foram determinadas a atividade e os níveis de expressão das defesas antioxidantes enzimáticas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx).



**Figura 2.** Efeito da OXA nos (A) níveis de ER e na atividade das enzimas (B) SOD (C) CAT e (D) GPx, em camundongos jovens e velhos. (\*)  $P < 0,05$ , (\*\*)  $P < 0,01$ , (\*\*\*)  $P < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo Jovem; (#)  $P < 0,05$ , (##)  $P < 0,01$  e (####)  $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo Velho; (+)  $P < 0,05$ , (++)  $P < 0,01$  e (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo Velho+OXA (ANOVA de duas vias seguido pelos testes de Newman-Keuls ou Tukey's).



**Figura 3.** Efeito da OXA nos níveis de expressão das enzimas (A) SOD (B) CAT e (C) GPx, em camundongos jovens e velhos. (\*)  $P < 0,05$ , (\*\*)  $P < 0,01$  e (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo Jovem; (#)  $P < 0,05$  e (##)  $P < 0,01$  quando comparado ao grupo Velho; (+)  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo Velho+OXA (ANOVA de duas vias seguido pelo teste Tukey).

Os resultados obtidos sugerem que o envelhecimento contribuiu para uma redução nas defesas antioxidantes, visto que a enzima CAT apresentou atividade (Figura 2C) e níveis de expressão (Figura 3B) reduzidos no grupo Velho quando comparado ao Jovem, sem a administração da OXA. Além disso, o tratamento com a OXA causou um aumento na atividade das enzimas SOD (Figura 2B) e GPx (Figura 2D) nos animais jovens. Entretanto, os velhos que receberam a OXA, mesmo com a elevação nos níveis de ER, não apresentaram alterações na

atividade das defesas antioxidantes analisadas (Figuras 2B-D). Estes resultados corroboram com os obtidos nos testes comportamentais.

Em contraponto aos resultados obtidos na análise da atividade das enzimas antioxidantes, quando considerado os níveis de expressão, os animais jovens e velhos que receberam OXA apresentaram uma redução na expressão da SOD, CAT e GPx (Figuras 3A-C). Entre essas, destaca-se a CAT que evidenciou maior redução nos animais do grupo Velho+OXA quando comparado ao grupo Jovem+OXA. De fato, este resultado sugere que o envelhecimento torna os camundongos mais vulneráveis à toxicidade induzida pela OXA. Além disso, os resultados indicam que a OXA conduz a depleção das defesas antioxidantes avaliadas.

#### 4. CONCLUSÕES

Baseado nas evidências apresentadas nesse estudo, pode-se inferir que mecanismos relacionados ao envelhecimento aumentaram a dor neuropática induzida pela OXA. Ainda, sugere-se que as defesas antioxidantes SOD, CAT e GPx podem ser alvos terapêuticos promissores para o estudo de novos tratamentos para neuropatia causada pelo tratamento com o fármaco OXA.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEARD, J.R.; OFFICER, A.; CARVALHO, I.A.; SADANA, R.; POT, A.M.; MICHEL, J.P.; LOYD-SHERLOCK, P.; EPPING-JORDAN, J.E.; PEETERS, G.; MAHANANI, W.R.; THIYAGARAJAN, A.J.; CHATTERJI, S. The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2145-2154, 2016.
- DE SANTANA, M.T.; OLIVEIRA, M.G.B.; SANTANA, M.F.; DE SOUSA, D.P.; SANTANA, D.G.; CAMARGO, E.A.; OLIVEIRA, A.P.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 9, p. 1144-1149, 2013.
- FITZMAURICE, C. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.
- FLATTERS, S.J.L.; DOUGHERTY, P.M.; COLVIN, L.A. Clinical and preclinical perspectives on chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): a narrative review. **BJA: British Journal of Anaesthesia**, v. 119, n. 4, p. 737-749, 2017.
- NICHETTI, F.; FALVELLA, F.S.; MICELI, R.; CHELI, S.; GAETANO, R.; FUCÀ, G.; INFANTE, G.; MARTINETTI, A.; ANTONIOTTI, C.; FALCONE, A.; DI BARTOLOMEO, M.; CREMOLINI, C.; de BRAUD, F.; PIETRANTONIO, F. Is a pharmacogenomic panel useful to estimate the risk of oxaliplatin-related neurotoxicity in colorectal cancer patients?. NICHETTI, Federico et al. Is a pharmacogenomic panel useful to estimate the risk of oxaliplatin-related neurotoxicity in colorectal cancer patients?. **The pharmacogenomics journal**, 2019. doi: 10.1038/s41397-019-0078-0
- STAROBOVA, H.; VETTER, I. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 174, 2017.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, n. 3, p. 300-307, 1944.