

## ENVOLVIMENTO DA VIA COLINÉRGICA NA NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS SWISS MACHOS E FÊMEAS: MTDZ COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA.

KETLYN P. DA MOTTA<sup>1</sup>; ANGÉLICA S. REIS<sup>2</sup>; NELSON LUÍS DE CAMPOS DOMINGUES<sup>3</sup>; BEATRIZ F. SANTOS<sup>4</sup>; CRISTIANE LUCHESE<sup>5</sup>; ETHEL A. WILHELM<sup>6\*</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – [mottaketlyn@yahoo.com.br](mailto:mottaketlyn@yahoo.com.br) <sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – [ge\\_schiavon@hotmail.com](mailto:ge_schiavon@hotmail.com) <sup>3</sup>Universidade Federal de Dourados – [nelsondomingues@ufgd.edu.br](mailto:nelsondomingues@ufgd.edu.br) <sup>4</sup>Universidade Federal de Dourados – [beatriz\\_biafuzinato@hotmail.com](mailto:beatriz_biafuzinato@hotmail.com) <sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – [cristiane\\_luchese@yahoo.com.br](mailto:cristiane_luchese@yahoo.com.br) (coorientadora) <sup>6\*</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – [ethelwilhelm@yahoo.com.br](mailto:ethelwilhelm@yahoo.com.br) (orientadora).

### 1. INTRODUÇÃO

A dor neuropática é o principal efeito adverso em pacientes que utilizam como tratamento a quimioterapia antineoplásica, sendo ainda a principal causa de dor em sobreviventes do câncer (NICHETTI et. al, 2019). A definição para dor neuropática é dada como: dor desencadeada por consequência direta de uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial (TREEDE et. al, 2008). Estima-se que a dor neuropática afete de 5 a 8% da população mundial, e este número aumenta significativamente quando associado ao tratamento quimioterápico (KRARUP-HANSEN et al., 2007).

O carcinoma de colorretal, particularmente, é o terceiro tipo de câncer mais frequente no mundo, apresentando elevada incidência em ambos os sexos. Este tipo de carcinoma representa a principal causa de mortes por câncer em mulheres (BRAY et al., 2018). A oxaliplatina (OXA) é o principal fármaco quimioterápico, derivado da platina, utilizado para o tratamento do carcinoma de colorretal (NICHETTI et. al, 2019).

A dor neuropática desencadeada pelo tratamento com a OXA é a principal toxicidade limitadora da dose, geralmente é grave, e frequentemente leva a interrupção do tratamento (STAROBOVA; VETTER, 2017). Apesar de numerosos estudos terem sido desenvolvidos com a finalidade de compreender a fisiopatologia da neuropatia periférica induzida pela OXA, muitos dos mecanismos ainda não foram totalmente elucidados (LOPRINZI et. al, 2014; GUO et. al, 2014). Além disso, estudos evidenciando as alterações no desenvolvimento da neuropatia em ambos os sexos ainda são pouco frequentes e necessários.

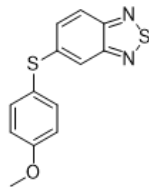
Sob esta perspectiva, a associação entre o sistema colinérgico e o desenvolvimento de processos dolorosos tem recebido a atenção de pesquisadores (BREIVIK, 2017; MCKUNE et al., 2017;). Neste contexto, compostos orgânicos contendo enxofre vem se destacando por apresentarem atividades relevantes em modelos de dor nociceptiva, inflamatória e neuropática e por modularem o sistema colinérgico (THANKACHAN et al. 2015; DE MELO, 2018).

Por conseguinte, o objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento da enzima acetilcolinesterase (AChE) no desenvolvimento da neuropatia periférica em camundongos machos e fêmeas; bem como, investigar o potencial farmacológico de um novo composto orgânico contendo enxofre para o tratamento desta neuropatia induzida pela OXA.

### 2. METODOLOGIA

Este estudo foi desenvolvido utilizando camundongos machos e fêmeas, adultos, da raça Swiss (25-35g). O composto estudado, 5-((4 metoxifenil)tio)benzo[c][1,2,5] tiodiazol (MTDZ) (Figura 1), foi sintetizado no

Laboratório de Catálise Orgânica e Biocatálise, da Universidade Federal de Grande Dourados. 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).



**Figura 1.** Estrutura química de 5-((4 metoxifenil)tio)benzo[c][1,2,5] tiodiazol (MTDZ).

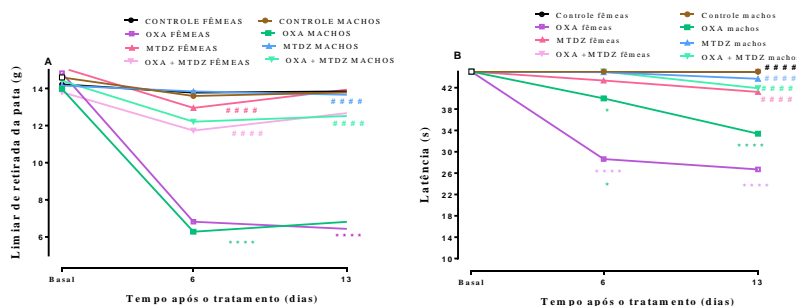
De acordo com o protocolo experimental, nos dias 0 e 2, os camundongos receberam OXA (10 mg/kg) ou soro glicosado (10 ml/kg) por via intraperitoneal. Dos dias 2 à 14, os animais receberam o tratamento com o composto MTDZ (1 mg/kg) ou veículo (óleo de canola, 10 ml/kg), ambos pela via per oral (p.o.). Primeiramente, a medida das sensibilidades mecânica e térmica foram avaliadas com a finalidade de determinar o limiar de dor induzido pelo tratamento com a OXA nos camundongos. Nos dias 0, 6 e 13 a sensibilidade mecânica dos animais foi mensurada com um análgésimetro 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 por meio do teste da placa quente, nos dias 0, 6, e 13, como descrito por WOOLFE E MACDONALD (1944). 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 lambear ou sacudir uma das patas ou saltar, foi registrado como reação. O tempo de permanência na placa foi limitado a 45 s.

No dia 15 do protocolo experimental, os animais foram submetidos a eutanásia e as estruturas de córtex e hipocampo foram retiradas afim de avaliar a atividade da enzima AChE. A atividade da enzima foi determinada colorimetricamente a 412 nm (ELLMAN, 1961).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

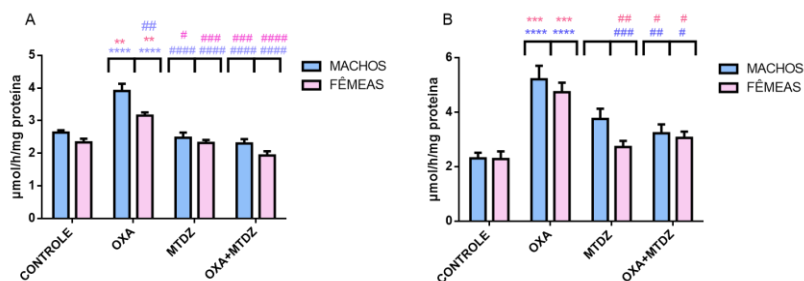
O tratamento com a OXA causou hipersensibilidade mecânica e térmica tanto em camundongos machos quanto fêmeas, como demonstrado na Figura 2A-B. Entretanto, destaca-se que as fêmeas, apresentaram maior sensibilidade térmica quando comparado ao grupo de machos expostos à OXA. Por outro lado, o MTDZ (1 mg/kg) reverteu a sensibilidade mecânica e térmica em ambos os sexos.



**Figura 2.** Efeito da OXA e do MTDZ na sensibilidade (A) mecânica e (B) térmica, em camundongos machos e fêmeas. (\*)  $P < 0,05$  (\*\*\*)  $P < 0,0001$  denotam níveis de significância quando comparado ao grupo controle. (####)  $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo induzido com a OXA. As cores da imagem estão associadas a legenda. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

Conforme demonstrado na Figura 3A-B, a OXA aumentou a atividade da AChE no córtex cerebral e no hipocampo de camundongos machos e fêmeas. O composto MTDZ (1 mg/kg) restaurou a atividade enzimática da AChE após a exposição ao quimioterápico.

A AChE é uma enzima importante a nível de sistema nervoso central e periférico, uma vez que degrada a acetilcolina na fenda sináptica e está envolvida na transmissão de impulsos nervosos. Sugere-se que a alteração na atividade da AChE pode estar envolvida na fisiopatologia da neuropatia periférica induzida pela OXA. De fato, um estudo recente demonstrou o aumento da atividade da AChE causado pela OXA em tecidos de córtex e hipocampo de camundongos (REIS et. al, 2020). Corroborando ainda a este resultado, Ferrier et. al (2015) correlacionou a redução de níveis de acetilcolina e aumento de colina em córtex de ratos ao aumento de hipersensibilidade mecânica nos animais, sugerindo uma ligação causal entre ambas. Em contrapartida, os resultados revelaram que o composto MTDZ foi capaz de regular a atividade da enzima AChE frente ao tratamento com a OXA. Por certo, estudos demonstram a atividade de compostos orgânicos contendo enxofre na modulação da via colinérgica (THANKACHAN et al. 2015; DE MELO, 2018).



**Figura 3.** Efeito da OXA e do composto MTDZ na atividade da acetilcolinesterase (AChE) nas estruturas cerebrais de (A) córtex e (B) hipocampo, em camundongos machos e fêmeas. (\*\*)  $P < 0,01$  (\*\*\*)  $P < 0,001$  (\*\*\*\*)  $P < 0,0001$  denotam níveis de significância quando comparado ao grupo controle. (#)  $P < 0,05$  (##)  $P < 0,01$  (###)  $P < 0,001$  (####)  $P < 0,0001$  denotam níveis de significância quando comparado ao grupo induzido com a OXA. As cores da imagem estão associadas a legenda. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey.

#### 4. CONCLUSÕES

Tendo em vista as evidências apresentadas neste estudo, pode-se concluir que a indução com a OXA aumentou a sensibilidade mecânica e térmica de camundongos machos e fêmeas, sendo as fêmeas mais susceptíveis a estimulação térmica. Ainda, o composto MTDZ (1 mg/kg) foi capaz de reverter a sensibilidade causada pela indução quimioterápica. Além disso, a modulação da atividade da AChE pelo MTDZ parece contribuir para a redução da neuropatia induzida pela OXA em ambos os sexos. Sendo assim, o composto MTDZ apresenta-se como uma possível estratégia terapêutica a ser amplamente estudada para o tratamento da neuropatia induzida pela OXA. Mais estudos se

fazem necessários para elucidar outros mecanismos envolvidos na atividade do composto.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, 68(6), 394-424.

BREIVIK, H. The burden of central anticholinergic drugs in creas espain and cognitive dysfunction. More knowled gea bout drug-interactions need ed. Scandinavian **Journal of Pain**, v.17, p.186-188, 2017.

DE MELO, I. S. F. (2018). 4-metil-benzenocarbotiamida apresenta atividades em modelos experimentais de dor e inflamação.

DE SANTANA, M.T.; OLIVEIRA, M.G.B.; SANTANA, M.F. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 9, p. 1144-1149, 2013.

ELLMAN, G. L; COURTNEY, K. D.; ANDRES, Jr. V.; FEATHERSTONE, M.R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, California, v.7, n.1, p.88-95, 1961.

FERRIER, J., BAYET-ROBERT, M., DALMANN, R (2015). Cholinergic neurotransmission in the posterior insular cortex is altered in preclinical models of neuropathic pain: key role of muscarinic M2 receptors in donepezil-induced antinociception. **Journal of Neuroscience**, 35(50), 16418-16430.

GUO, S., & FRASER, M. W. (2014). *Propensity score analysis: Statistical methods and applications* (Vol. 11). **SAGE publications**.

KRARUP-HANSEN, A., HELWEG-LARSEN, S., SCHMALBRUCH, H., RØRTH, M., & KRARUP, C. (2007). Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. **Brain**, 130(4), 1076-1088.

LOPRINZI, C. L., QIN, R., DAKHIL, S. R., FEHRENBACHER, L., FLYNN, K. A., ATHERTON, P. & GROTHEY, A. (2014). Phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of intravenous calcium and magnesium to prevent oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity. **Journal of Clinical Oncology**, 32(10), 997.

MCKUNE, C.M.; MURRELL, J.C.; NOLAN, A.M.; WHITE, K.L.; WRIGHT, B.D., Nociceção e Dor. **Anestesiologia e Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5 ed., 2017. Cap.29, p.576-619.

NICHETTI, F.; FALVELLA, F.S.; MICELI, R. Is a pharmacogenomic panel useful to estimate the risk of oxaliplatin-related neurotoxicity in colorectal cancer patients. **The pharmacogenomics journal**, 2019.

REIS, A. S., PALTIAN, J. J., DOMINGUES, W. B., NOVO, D. L., COSTA, G. P., ALVES, D. & WILHELM, E. A. (2020). Advances in the Understanding of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Mice: 7-Chloro-4-(Phenylselanyl) Quinoline as a Promising Therapeutic Agent. **Molecular Neurobiology**, 1-16.

STAROBOVA, H., & VETTER, I. (2017). Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Frontiers in molecular neuroscience**, 10, 174.

THANKACHAN, A.P.; SINDHU, K.S.; KRISHNAN, K.K.; ANILKUMAR, G.A. Novel and efficient zinc-catalyzed thioetherification of aryl halides. **RSC Advances**, v.5, p.32675-32678, 2015

TREEDE, R. D., JENSEN, T. S., CAMPBELL, J. N (2008). Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, 70(18), 1630-1635.

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.