

## MTDZ MODULA OS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO E ATIVIDADE DA $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase NA SENSIBILIDADE MECÂNICA CAUSADA POR PACLITAXEL

KETLYN P. MOTTA<sup>1</sup>; CAROLINA C. MARTINS<sup>2</sup>; NELSON DOMINGUES<sup>3</sup>; CRISTIANE LUCHESE<sup>4</sup>; ETHEL A. WILHELM<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mottaketlyn@yahoo.com.br](mailto:mottaketlyn@yahoo.com.br);

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [carol\\_cristovao@hotmail.com](mailto:carol_cristovao@hotmail.com);

<sup>3</sup>Universidade Federal de Dourados – [nelsondomingues@ufgd.edu.br](mailto:nelsondomingues@ufgd.edu.br);

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [cristiane\\_luchese@yahoo.com.br](mailto:cristiane_luchese@yahoo.com.br);

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [ethelwilhelm@yahoo.com.br](mailto:ethelwilhelm@yahoo.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O paclitaxel (PTX) é um quimioterápico amplamente utilizado na clínica oncológica. O PTX atua promovendo a morte celular por meio da desestabilização dos microtúbulos, interferindo na polimerização dinâmica, induzindo assim a parada da mitose (AL-MAHAYRI; ALAHMAD; ALI, 2021). Em outras palavras, o PTX é altamente eficiente em inibir o crescimento tumoral.

Utilizado para uma diversa linha de carcinomas como de próstata, mama, endométrio, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de bexiga e carcinoma cervical, o PTX é considerado um dos mais importantes agentes quimioterápicos do século XXI (TAMBURIN et al., 2019). Apesar da sua eficácia, o uso de PTX está atrelado ao desenvolvimento de neurotoxicidade, principalmente devido a promoção de quadros severos de neuropatia periférica.

Estima-se que cerca de 60-70% das pessoas expostas ao PTX desenvolvem dor neuropática (STAFF et al., 2019). Os sintomas patológicos desencadeados pelo PTX interferem drasticamente na qualidade de vida dos pacientes em estado de calamidade oncológica (MIASKOWSKI et al., 2019). Por este motivo, atualmente, a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos do PTX se faz tão necessária para possibilitar uma futura estratégia terapêutica. Visando compreender melhor a dinâmica de ação do PTX e também explorar novos protótipos à neuropatia periférica, conjecturamos a utilização terapêutica do composto 5-((4-metoxifenil)tio)benzo[c][1,2,5] tiodiazol (MTDZ). O MTDZ é um composto tiodiazólico contendo enxofre, que apresenta potencial efeito antioxidante e se mostrou capaz de reduzir o efeito nociceptivo em um modelo de neuropatia causado pela oxaliplatina (OXA) (MOTTA et al., 2022).

Motivados pelos promissores efeitos do MTDZ no modelo anterior de dor neuropática desencadeada por OXA, sugeriu-se utilizá-lo, desta vez, em um modelo de neuropatia induzido pelo PTX. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antinociceptivo do MTDZ frente ao PTX e aos níveis de óxido nítrico (NO); bem como na atividade da enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, sendo esses possíveis mecanismos envolvidos na ação neurotóxica do PTX.

### 2. METODOLOGIA

Este estudo foi desenvolvido utilizando camundongos machos e fêmeas, adultos, da raça Swiss (25- 35g). O composto estudado (MTDZ) 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 (CEEA 4506-2017).

## 2.1. Protocolo Experimental

Os camundongos machos e fêmeas foram divididos nos seguintes grupos experimentais: I) Controle; II) PTX; III) MTDZ; e IV) PTX + MTDZ. Nos dias 1, 2 e 3 do protocolo experimental os grupos II e IV receberam o PTX (2 mg/kg; intraperitoneal) enquanto os grupos I e III receberam o veículo glicose 5%. Do 3º ao 14º dia os animais receberam MTDZ (grupos III e IV) na dose de 1 mg/kg (pela via intragástrica)(i.g.) ou óleo de canola (grupos I e II) na concentração de 10 mL/kg (i.g.). No 15º dia os animais foram submetidos a eutanásia e o córtex cerebral e medula espinhal foram coletados para posteriores análises bioquímicas.

## 2.2. Avaliação da sensibilidade mecânica

Foi avaliada a nocicepção por meio da sensibilidade mecânica nos dias 8, 11 e 14 do protocolo experimental. A resposta à sensibilidade mecânica se deu por meio de um analgesímetro digital conforme descrito por Alamri et al. (2018).

## 2.3 Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico e atividade da $Ca^{2+}$ -ATPase

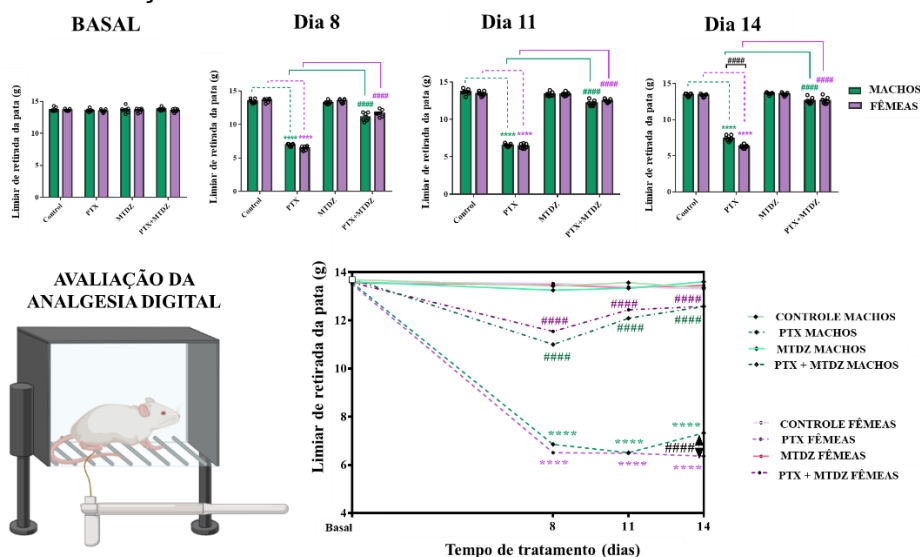
As estruturas do córtex cerebral e da medula espinhal foram dessecadas e posteriormente analisadas espectrofotometricamente. O ensaio da avaliação dos níveis de NO se deu conforme descrito por Miranda et al. (2001). Já o ensaio de observação da atividade da  $Ca^{2+}$  - ATPase foi realizado conforme Trevisan et al. (2009).

## 2.4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Tukey. Os resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

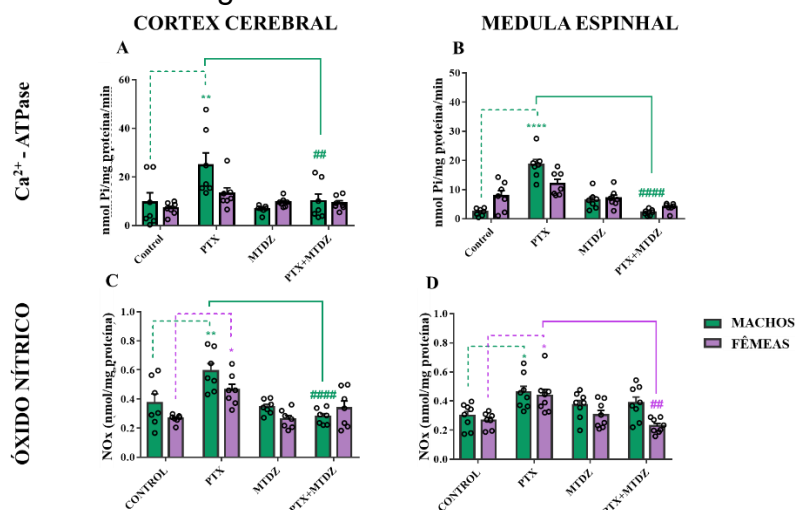
Como já era esperado, o PTX induziu hipersensibilidade mecânica, uma resposta típica relacionada a neuropatia periférica associada a quimioterápicos (Figura 1). Nosso estudo demonstrou o aumento significativo da hiperalgesia mecânica nos dias 8 (48,9% em machos e 51,8% em fêmeas), 11 (52,0% em machos e 51,5% em fêmeas) e 14 (45,1% em machos e 52,1% em fêmeas) nos camundongos que receberam PTX em relação ao controle. Foi verificada, ainda, no dia 14 uma sensibilidade mecânica exacerbada das fêmeas que receberam PTX em relação aos machos. Em contrapartida, evidencia-se o potencial antinociceptivo do composto MTDZ perante a ação do PTX em ambos os sexos.



**Figura 1.** Efeito do PTX e do composto MTDZ perante a avaliação da sensibilidade mecânica em camundongos machos e fêmeas. (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  e (\*\*\*)  $p < 0,0001$  denotam níveis de significância quando comparado ao grupo controle machos e fêmeas, respectivamente. (####)  $p < 0,0001$ , (####)  $p < 0,0001$  e (####)  $p < 0,0001$  denotam níveis de significância em relação ao grupo PTX entre machos, fêmeas e entre os sexos, respectivamente.

Corroborando a estes achados, foi observado o aumento da atividade da enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase no córtex (Figura 2A) e na medula espinal (Figura 2B) de camundongos machos expostos ao PTX quando comparados ao grupo controle. Notavelmente, no córtex cerebral de machos um aumento de cerca de 159,1% foi verificado, enquanto que na medula constatou-se 710,1% de aumento. O  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular alterado tem sido relacionado como um mecanismo de ação do PTX estritamente relacionado ao desenvolvimento de excitabilidade neuronal, morte celular e desenvolvimento de quadros dolorosos (USACHEV et al., 2002). Logo, o MTDZ caracterizou-se como um interessante modulador da enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase quando alterada; visto que normalizou a atividade enzimática no córtex e medula espinal de camundongos machos expostos ao PTX.

Além disso, o PTX apresenta como principal via de ação neurotóxica a ativação de mecanismos inflamatórios como a via do NO (ZHANG et al., 2019). De fato, nas estruturas de córtex (Figura 2C) e medula (Figura 2D) o PTX ocasionou um aumento significativo dos níveis de NO. Em machos o aumento dos níveis de NO foi observado em 58,7% no córtex cerebral e 58,6% na medula espinal. Já em fêmeas este aumento correspondeu a 77,3% no córtex e 68,1% na medula. O MTDZ foi capaz de normalizar os níveis de NO no córtex de camundongos machos e na medula de camundongos fêmeas.



**Figura 2.** Efeito do PTX e do composto MTDZ na avaliação dos níveis de NO no córtex cerebral (C) e medula espinal (D) e na atividade da enzima  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase no córtex cerebral (A) e na medula espinal (B). (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  denotam níveis de significância quando comparado ao grupo controle. (##)  $p < 0,01$  e (####)  $p < 0,0001$  denotam níveis de significância em relação ao grupo PTX.

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos seguintes resultados pode-se inferir que o PTX levou ao aumento da sensibilidade mecânica nos animais, sendo que no dia 14 do protocolo as fêmeas apresentaram uma resposta exacerbada a esta nocicepção em relação aos machos. Além disso, o PTX alterou a homeostase da enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e ocasionou o aumento dos níveis de NO; sendo estes resultados tecido-específicos.

e diferente entre sexos. O MTDZ se apresentou como um interessante modulador dos prejuízos desencadeados pelo PTX em ambos os sexos.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MAHAYRI, Zein; ALAHMAD, Mohammad; ALI, Bassam. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology Current opinion on the pharmacogenomics of paclitaxel-induced toxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. 785–802, 2021. DOI: 10.1080/17425255.2021.1943358.

ALAMRI, Faisal; SHOYAIB, Abdullah; BIGGERS, Abbie; JAYARAMAN, Srinidhi; GUINDON, Josée; KARAMYAN, Vardan. Applicability of the grip strength and automated von Frey tactile sensitivity tests in the mouse photothrombotic model of stroke. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 336, n. August 2017, p. 250–255, 2018.

MIASKOWSKI, Christine. Perturbations in neuroinflammatory pathways are associated with paclitaxel-induced peripheral neuropathy in breast cancer survivors. **Journal of Neuroimmunology**, [S. l.], v. 335, n. June, p. 577019, 2019.

MIRANDA, Katrina. Unique Oxidative Mechanisms for the Reactive Nitrogen Oxide Species, Nitroxyl Anion \*. [S. l.], v. 276, n. 3, p. 1720–1727, 2001.

MOTTA, Ketlyn; SANTOS, Beatriz; DOMINGUES, Nelson Luís De; LUCHESE, Cristiane; WILHELM, Ethel. Target enzymes in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in Swiss mice: A new acetylcholinesterase inhibitor as therapeutic strategy. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 352, n. November 2021, p. 109772, 2022.

STAFF, Nathan; FEHRENBACHER, Jill; CAILLAUD, Martial; DAMAJ, Imad; SEGAL, Rosalind; RIEGER, Sandra. Pathogenesis of paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A current review of in vitro and in vivo findings using rodent and human model systems. **Journal Pre-proof**, [S. l.], p. 113121, 2019.

TAMBURIN, Stefano; PARK, Susanna; ALBERTI, Paola; DEMICHELIS, Chiara; SCHENONE, Angelo; ARGYRIOU, Andreas. Taxane and epothilone-induced peripheral neurotoxicity : From pathogenesis to treatment. [S. l.], v. 24, n. June, p. 40–51, 2019.

TREVISAN, Gabriela et al. Full Papers. [S. l.], p. 608–612, 2009.

USACHEV, Yuriy; DEMARCO, Steven; CAMPBELL, Colin; STREHLER, Emanuel; THAYER, Stanley; HALL, Jackson; SE, Church Street. Bradykinin and ATP Accelerate Ca<sup>2+</sup> Efflux from Rat Sensory Neurons via Protein Kinase C and the Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Pump Isoform 4. [S. l.], v. 33, p. 113–122, 2002.

ZHANG, Yangmiao; BREWER, Abigail L.; NELSON, Jordan T.; SMITH, Paxton T.; SHIRACHI, Donald Y. Hyperbaric oxygen produces a nitric oxide synthase-regulated anti-allodynic effect in rats with paclitaxel-induced neuropathic pain. **Brain Research**, [S. l.], v. 1711, n. December 2018, p. 41–47, 2019.