

ENVOLVIMENTO DAS ENZIMAS Na^+/K^+ -ATPASE E ACETILCOLINESTERASE NA DOR NEUROPÁTICA AGUDA INDUZIDA PELA OXALIPLATINA EM RATOS FÊMEAS: 4-APSB COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA

DANIELE M. ALTENBURG¹; VANESSA M. E. DA ROCHA²; ANA PAULA B. WILLE³; SABRINA B. ACOSTA⁴; DIEGO ALVES⁵; ETHEL A. WILHELM⁶

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)– danielaltenburg@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)– vns Macedo@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)– anapaulabonatowille@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – bina220598@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – dsalves@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)– ethelwilhelm@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer colorretal é o terceiro tipo mais comum diagnosticado no Brasil, com uma estimativa de 45.630 novos casos anuais para o período de 2023 a 2025. Isso representa um risco de 21,10 casos por 100 mil habitantes, sendo ligeiramente maior entre as mulheres, com 21,41 casos novos a cada 100 mil habitantes, comparado a 20,78 casos por 100 mil homens (DE OLIVEIRA SANTOS, 2023). O tratamento quimioterápico ainda é a principal alternativa para combater o câncer, sendo a oxaliplatina (OXA) um dos fármacos mais utilizados para o tratamento. No entanto, apesar de sua eficácia, a OXA pode causar efeitos adversos significativos, especialmente a neuropatia periférica (NICHETTI et al., 2019). Pacientes tratados com OXA frequentemente desenvolvem neuropatia periférica aguda, caracterizada por sintomas como dor e hipersensibilidade ao frio, que afetam entre 85% e 95% dos casos (KANG et al., 2021; STAROBOVA e VETTER, 2017).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a OXA causa neurotoxicidade periférica, principalmente, por inibir a atividade e reduzir a expressão da Na^+/K^+ -ATPase, sugerindo que a modulação deste transportador transmembrana pode ser uma estratégia promissora para o tratamento da neuropatia periférica induzida pela OXA (REIS et al., 2020,2022). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a OXA aumenta a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no córtex cerebral, hipocampo e medula espinhal de camundongos machos e fêmeas, indicando uma possível correlação entre essa enzima e a fisiopatologia da dor neuropática (DA MOTTA et al.,2022). No entanto, os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade causada pela OXA ainda não foram completamente elucidados. Assim como, não há um medicamento que seja específico para o tratamento dessa patologia (KAWASHIRI et al., 2021).

Nesse sentido, o composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida (4-APSB) tem se destacado por seus diversos efeitos biológicos promissores em modelos de nocicepção aguda, dentre eles, os efeitos antioxidante, antinociceptivo e anti-dematogênico (SACRAMENTO et al., 2022). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico do 4-APSB frente a dor neuropática aguda induzida pela OXA, avaliando especialmente a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e AChE no córtex cerebral e medula espinhal de ratos fêmeas.

2. METODOLOGIA

Os experimentos deste estudo foram realizados seguindo as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) (CEUA 4506-2017). Nesse estudo, foram utilizados ratos Wistar adultos, fêmeas, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFPel. O composto 4-APSB (Figura 1) foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da UFPel, conforme descrito por SACRAMENTO et al. (2022).

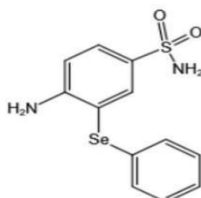


Figura 1. Estrutura química do composto 4-amino-3 (fenilselanyl)benzenosulfonamida (4-APSB).

A indução da dor neuropática pela OXA foi realizada de acordo com o protocolo experimental descrito por KAWASHIRI et al. (2012). Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (9 animais/grupo): I) Controle, II) 4-APSB, III) OXA, IV) OXA + 4-APSB, e V) OXA + DULOXETINA. Nos dias 1 e 2, os animais dos grupos III, IV e V receberam OXA (4 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p.), enquanto os animais do grupo I e II receberam seu veículo de diluição (solução de glicose a 5%, 10 mL/kg, i.p.). No dia 2 do protocolo experimental, 0,5 h após a administração de OXA, os animais dos grupos II e IV receberam uma única administração de 4-APSB (1 mg/kg) pela via intragástrica (i.g) e os animais do grupo V receberam Duloxetina (30 mg/kg, i.g), e os animais dos grupos I e III receberam óleo de canola (10 mL/kg, i.g), veículo de diluição do composto 4-APSB e da Duloxetina. As sensibilidades mecânica e térmica foram avaliadas antes da administração da OXA (valores basais) e 0,5 h após o tratamento com 4-APSB e Duloxetina a fim de determinar o limiar de sensibilidade dos animais. Após os testes comportamentais, foi realizada a eutanásia dos animais, com sobredose de anestésico isoflurano. Na sequência, a estrutura de córtex cerebral foi retirada a fim de avaliar a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e AChE, enquanto a estrutura de medula espinhal foi retirada a fim de avaliar a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, conforme metodologia descrita por FISKE e SUBBAROW (1925) e ELLMAN et al. (1961), respectivamente.

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 uma via, seguida pelo teste de Tukey. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento com a OXA induziu hipersensibilidade mecânica e térmica nos animais, resultando em uma redução de 37% no limiar de retirada da pata no teste de sensibilidade mecânica, e um aumento de 182% na sensibilidade ao frio, em comparação ao grupo controle. Por outro lado, os animais tratados com o composto 4-APSB (1 mg/kg) e com Duloxetina (30 mg/kg), utilizado como fármaco de referência, mostraram uma redução na sensibilidade mecânica e térmica induzida pela OXA, resultando em um aumento de 31% e 42% no limiar de retirada da pata, e uma redução de 64% e 88% na sensibilidade térmica, respectivamente, em comparação ao grupo OXA (dados não apresentados).

Os resultados ilustrados na Figura 2 demonstraram que a administração da OXA inibiu a atividade da Na^+/K^+ -ATPase, tanto no córtex cerebral (Figura 2A)

quanto na medula espinhal (Figura 2B) dos animais, em comparação ao grupo controle. Esses achados indicam que a indução com a OXA causou um comprometimento na manutenção do potencial de membrana neuronal em ambos os tecidos cerebrais, corroborando a ideia de que a modulação deste transportador pode ser uma estratégia promissora para o tratamento da neuropatia periférica induzida pela OXA (REIS et al., 2022). Além disso, os animais que receberam a OXA apresentaram um aumento significativo na atividade da enzima AChE no córtex cerebral (Figura 2C), em comparação ao grupo controle. A AChE é uma enzima crucial tanto no sistema nervoso central quanto no periférico, pois degrada a acetilcolina na fenda sináptica e participa da transmissão dos impulsos nervosos. Alterações na atividade da AChE podem estar relacionadas à fisiopatologia da neuropatia periférica induzida pela OXA (DA MOTTA et al., 2022; FERRIER et al., 2015; REIS et al., 2020), o que reforça a relevância dos nossos achados.

O tratamento com o 4-APSB (1 mg/kg), por sua vez, reverteu os danos causados pela administração da OXA. Ou seja, normalizou a atividade da Na^+/K^+ -ATPase (Figuras 2A-B) e da enzima AChE (Figura 2C), nos tecidos avaliados, indicando um efeito modulador sobre a hiperexcitabilidade neuronal e transmissão colinérgica, respectivamente. Além disso, a Duloxetine (30 mg/kg), medicamento de referência utilizado no estudo, também foi capaz de atenuar os danos causados pela OXA, tanto sobre a Na^+/K^+ -ATPase, quanto sobre a AChE, em ambos os tecidos avaliados. Dessa forma, esses achados sugerem que a administração de 4-APSB na dose de 1 mg/kg restaurou tanto a função da Na^+/K^+ -ATPase quanto a atividade da AChE. Isso indica que a proteína transmembrana Na^+/K^+ -ATPase e a via colinérgica são alvos promissores que podem ser modulados pelo 4-APSB para o tratamento da dor neuropática aguda induzida pela OXA.

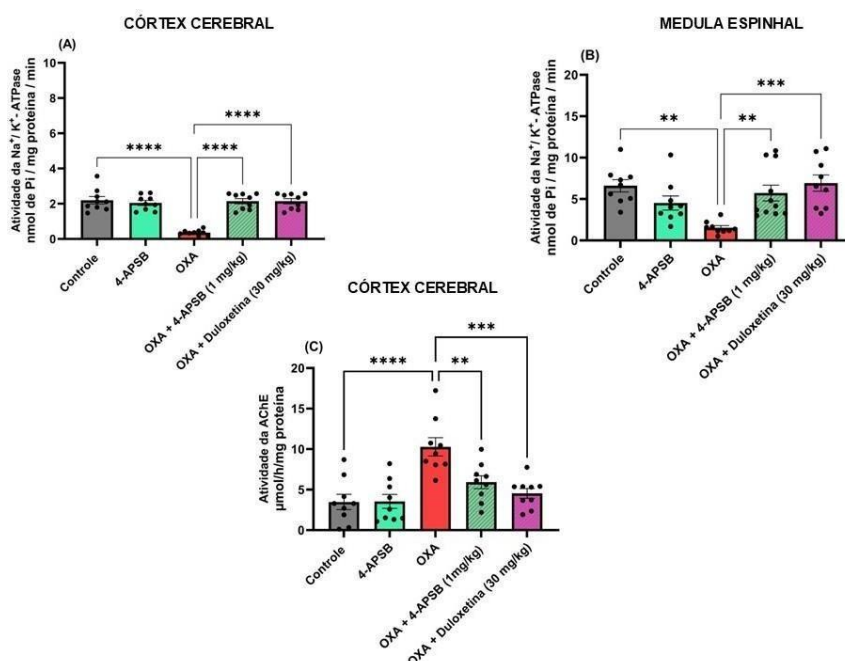


Figura 2. Efeito do composto 4-amino-3-(fenilselanil)benzenosulfonamida (4-APSB) na atividade da Na^+/K^+ -ATPase nas estruturas de (a) córtex cerebral e (b) medula espinhal; e atividade da acetilcolinesterase (AChE) no córtex cerebral (c), de ratos Wistar fêmeas em um modelo de neuropatia periférica aguda induzida pela oxaliplatina (OXA). Os asteriscos indicam níveis de significância quando comparados ao grupo OXA (** p < 0,01; (***) p < 0,001; (****) p < 0,0001. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

4. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos foi possível observar que a OXA causou um comprometimento na atividade das enzimas Na⁺/K⁺-ATPase e AChE em tecidos cerebrais de ratos Wistar fêmeas. Diante disso, o 4-APSB (1 mg/kg) foi capaz de restaurar a função enzimática comprometida pela OXA, surgindo como uma alternativa terapêutica promissora no tratamento da dor neuropática aguda.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DA MOTTA, K.P. et al. Target enzymes in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in Swiss mice: A new acetylcholinesterase inhibitor as therapeutic strategy. **Chemico-Biological Interactions**, v. 352, p. 109772, 2022.
- DE OLIVEIRA SANTOS, M. et al. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p.4-5, 2023.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v.7, n.1, p.88-95, 1961
- FERRIER, Jérémy et al. 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**, v. 35, n.50, p. 16418-16430, 2015.
- FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v.66, p.375–400, 1925.
- KANG, Lumei et al. Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical features, mechanisms, prevention and treatment. *Journal of neurology*, v. 268, p. 3269-3282, 2021.
- KAWASHIRI, T. et al. L Type Ca 2+ Channel Blockers Prevent Oxaliplatin-Induced Cold Hyperalgesia and TRPM8 Overexpression in Rats. **Molecular Pain**, v.8, p.1744-8069-8–7, 1 jan. 2012.
- KAWASHIRI, Takehiro et al. Therapeutic agents for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy; experimental and clinical evidence. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 3, p. 1393, 2021.
- NICHETTI, F. et al. Is a pharmacogenomic panel useful to estimate the risk of oxaliplatin-related neurotoxicity in colorectal cancer patients? *The Pharmacogenomics Journal*, v. 19, n. 5, p. 465–472, 4 out. 2019.
- REIS, A. S. et al. Advances in the understanding of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in mice: 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline as a promising therapeutic agent. **Molecular Neurobiology**, v. 57, p. 5219-5234, 2022.
- REIS, A. S. et al. Pharmacological modulation of Na⁺, K⁺-ATPase as a potential target for OXA-induced neurotoxicity: Correlation between anxiety and cognitive decline and beneficial effects of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline. **Brain Research Bulletin**, v. 162, p. 282-290, 2020.
- SACRAMENTO, Manoela et al. Synthesis and Evaluation of Antioxidant, Anti-Edematogenic and Antinociceptive Properties of Selenium-Sulfa Compounds. **ChemMedChem**, v. 17, n. 4, p. e202100507, 2022.
- STAROBOVA, Hana; VETTER, Irina. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 174, 2017.