



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

VITÓRIA WIBBELT DOS SANTOS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTES EM MODELO DE  
NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM  
CAMUNDONGOS**

Florianópolis

2019

Vitória Wibbelt dos Santos

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTES EM MODELO DE  
NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM  
CAMUNDONGOS**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho

Florianópolis

2019



Vitória Wibbelt dos Santos

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTES EM MODELO DE  
NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM  
CAMUNDONGOS**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências da Saúde.

Florianópolis, 27 de junho de 2019.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marení Rocha Farias  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dirleise Colle  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi  
Universidade Federal de Santa Catarina

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela sua maravilhosa e eterna Graça; pelo seu infinito e grandioso amor; por todas as bênçãos que o Senhor derramou em minha vida até aqui, e por nunca me deixar só.

Agradeço ao professor Alfeu por ter aceitado ser meu orientador durante a iniciação científica e TCC, por todo conhecimento que me transmitiu, pela paciência em explicar e ensinar, por se mostrar sempre disponível a ajudar, e também pelos momentos de distração fora do laboratório, proporcionando momentos de união da equipe. Eu te admiro muito como professor, pai, marido, amigo e pesquisador.

Um agradecimento aos meus colegas de laboratório, Marina, Jonathan e Rosângela, por fazerem o dia-a-dia no “lab” um pouco mais leve, pela paciência em me explicar cada experimento, pelas palavras de incentivo quando tudo parecia ser impossível e por todos os momentos que tive a oportunidade de compartilhar com vocês. Saibam que vocês não foram apenas colegas, e sim amigos.

Agradeço aos professores Dirleise Colle, Carlos Rogério Tonussi e Fabíola B. F. Monteiro por aceitarem o convite para compor a banca, sejam como titulares ou suplentes, pela disponibilidade e pelas contribuições.

O dia-a-dia na universidade não é nada fácil, é cansativo e, muitas vezes, nos sentimos esgotados. Nesses momentos, principalmente, percebemos que temos amigos maravilhosos ao nosso lado. Agradeço aos meus amigos do forró pelos momentos divertidíssimos que passamos juntos; aos meus amigos da Igreja no Cinema (INC Floripa), em especial a Sabrina e a Hellen, pelas palavras de amor que sempre tinham para me dar, por sempre me acolherem, me fazendo sentir parte da família de vocês; aos meus amigos de faculdade, Meice, Malu e Ju, pelos momentos que passamos juntas; à Karla, que em muitos momentos foi minha segunda mãe em Floripa; ao Johnathan, meu amigo de longa data que posso chamar de irmão; aos meus amigos de Mafra; e ao Gabriel, que há pouco tempo entrou na minha vida, mas já fez com que meus dias ficassem mais alegres, principalmente nas segundas-feiras.

Quero fazer um agradecimento especial a uma amiga que fiz logo no início do curso e que me acompanhou até o final. Nanda, obrigada por todos os momentos que compartilhamos juntas, pelos desesperos antes das provas, pelos estudos coletivos, pelas comemorações, festas, comilanças, por sempre ter um espaço na sua casa para me receber.

Somos pessoas totalmente diferentes, e é por isso que a gente já brigou muito, mas é por isso também que nos damos tão bem. Obrigada por esses cinco anos de caminhada juntas, e tenho certeza que nossa amizade vai longe.

Faço um agradecimento também aos meus avós, Sônia, Augustinho, Marly e Hygino, por sempre estarem ao meu lado, pelas sábias palavras nos momentos difíceis e por todo apoio mesmo que de longe. Em especial, quero agradecer o meu vô Hygino, por me mostrar a cada dia que temos que lutar e nunca desistir do que queremos; você é um exemplo de perseverança.

Por último, e não menos importante, um agradecimento mais do que especial aos meus pais, Adriana e Sérgio. É até difícil escrever, porque palavras nunca serão suficientes para demonstrar a gratidão por tudo que vocês fizeram e fazem por mim. Sei que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Não é fácil viver longe de vocês, mas saibam que cada palavra de incentivo, de amor e de carinho, me faz perceber que toda essa distância vale a pena. Obrigada por todo apoio que me dão. Vocês serão sempre meus maiores exemplos. Eu amo vocês mais do que possam imaginar!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar, 1829 - 1877)

## RESUMO

O câncer de mama é um dos mais comuns entre as mulheres e um dos fármacos preconizados para o tratamento dessa doença é o paclitaxel (PTX). Contudo, um efeito adverso muito frequente com o uso desse fármaco é o desenvolvimento de neuropatia periférica induzida por quimioterapia (NPIQ), a qual pode afetar significativamente a qualidade de vida dos pacientes em tratamento quimioterápico, bem como pode gerar casos de resistência ao fármaco e afetar a eficácia terapêutica. Estudos mostram que animais com neuropatia periférica induzida por quimioterapia, neste caso por paclitaxel, apresentam danos em mitocôndrias, levando ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e, conseqüentemente, desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da N-acetilcisteína (NAC), ácido lipoico (AL) e vitamina E, todos antioxidantes, na hiperalgesia mecânica e alodinia ao frio em modelo de neuropatia periférica induzida pelo paclitaxel em camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*. A neuropatia foi induzida através da administração intraperitoneal de paclitaxel 5 mg/kg e o tratamento com os antioxidantes foi realizado por via oral (gavagem), todos na dose de 50 mg/kg, durante 14 dias. Para avaliar a nocicepção mecânica e térmica foram utilizados os testes de Von Frey e da placa fria, respectivamente. Após a finalização do tratamento, foram realizadas análises bioquímicas para avaliar os níveis de marcadores de toxicidade hepática e renal, como alanina aminotransferase (ALT) e creatinina, além das dosagens do perfil de estresse oxidativo (detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS –, detecção de grupamentos sulfidril e detecção de proteínas carboniladas). Além disso, através do implante de tumores subcutâneos de Ehrlich, avaliamos se os antioxidantes possuem efeitos anti ou pró-tumorais in vivo. O tratamento com os antioxidantes reduziu a nocicepção mecânica e alodinia ao frio induzida pelo paclitaxel quando iniciado concomitante com o quimioterápico. As mesmas doses antioxidantes que atenuaram parâmetros de nocicepção também inibiram a lipoperoxidação em tecido hepático induzida por paclitaxel, ao passo que a carbonilação proteica e alterações em tióis proteicos não foram alteradas pelo antitumoral. Em modelos de tumor subcutâneo, o crescimento tumoral não foi negativamente afetado pelo uso dos antioxidantes, porém a linhagem celular implantada mostrou-se resistente ao paclitaxel. Sendo assim, os dados mostram que o uso da NAC, ácido lipoico e vitamina E pode ter relevância farmacológica no tratamento da NPIQ, embora nossos estudos tenham sido realizados em modelo não-clínico de NPIQ. Aprovação CEUA-UFSC n ° 3722260417.

**Palavras-chave:** câncer; neuropatia; paclitaxel; antioxidantes.

## ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common cancer type among women and one of the drugs advocated for the treatment of this disease is paclitaxel (PTX). However, a very frequent adverse effect associated with this drug is the development of chemotherapy-induced peripheral neuropathy (NPIQ), which can significantly affect the quality of life of patients undergoing chemotherapy, as well as may lead to drug resistance and affect therapeutic efficacy. Previous studies show that animals with paclitaxel-induced peripheral neuropathy present damage to mitochondria, leading to the increase of reactive oxygen (ROS) and reactive nitrogen (RNS) species, and development of oxidative stress that promote peripheral neuron damage. On the other hand, the impact of different antioxidants in paclitaxel-induced peripheral neuropathy as well as how the affect paclitaxel antitumor effect remains unknown. The aim of this study was evaluate the effect of the antioxidants N-acetylcysteine (NAC), lipoic acid (AL) and vitamin E supplementation on mechanical hyperalgesia and cold allodynia in a model of peripheral neuropathy induced by paclitaxel in mice. Neuropathy was induced by intraperitoneal administration of paclitaxel 5 mg/kg in alternate days, and treatment with the antioxidants was done orally (gavage), all at a dose of 50 mg/kg/day, for 14 days. Von Frey and cold plate tests, respectively, were used to evaluate mechanical and thermal nociception. At the end of treatments, biochemical analyzes were performed to evaluate the levels of serum markers of hepatic and renal toxicity, such as alanine aminotransferase (ALT) and creatinine, as well as the oxidative stress profile (thiobarbituric acid reactive substances TBARS; sulfhydry groups; and carbonylated proteins). Treatment with antioxidants reduced mechanical nociception and cold allodynia induced by paclitaxel in Von Frey and Cold Plate tests. Antioxidants attenuated paclitaxel-induced lipoperoxidation in liver tissues whereas heart and kidney showed no evidence of oxidative damage by paclitaxel. None evidence of liver and kidney toxicity among treatments was observed in ALT and creatinine assays. Tumor growth was not affected by antioxidants, even though the Ehrlich tumors showed resistance to paclitaxel monotreatment. Therefore, the herein presented data indicate that NAC, lipoic acid and vitamin E may be of pharmacological relevance in the treatment of NPIQ, although more in-depth preclinical and clinical studies are needed.

**Keywords:** cancer; neuropathy; paclitaxel; antioxidants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do paclitaxel .....	17
Figura 2 – Mecanismo de ação do paclitaxel.....	18
Figura 3 – Mecanismo da nocicepção.....	20
Figura 4 – Representação esquemática das reações do sistema antioxidante enzimático .....	22
Figura 5 – Estrutura química da NAC .....	23
Figura 6 – Representação esquemática da síntese de glutathiona e sua formação a partir da NAC.. .....	24
Figura 7 – Estrutura química do ácido lipoico .....	25
Figura 8 – Possíveis mecanismos de ação do ácido lipoico e ácido dihidrolipoico (DHLA). .	25
Figura 9 – Estrutura química da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) .....	26
Figura 10 – Mecanismo de ação da vitamina E.....	27
Figura 11 – Limiares de nocicepção no tratamento com diferentes antioxidantes em modelo de neuropatia periférica induzida por paclitaxel em camundongos <i>Swiss</i> .....	37
Figura 12 – Efeito do tratamento com NAC, ácido lipoico (AL) e vitamina E sobre o desenvolvimento de tumores de Ehrlich em modelo de neuropatia periférica induzida por paclitaxel em camundongos fêmeas <i>Swiss</i> . .....	38
Figura 13 – Efeito da suplementação de NAC, ácido lipoico (AL) e vitamina E sobre marcadores de danos oxidativos em tecidos periféricos de camundongos fêmeas <i>Swiss</i> com NPIQ por paclitaxel .....	39

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Escala utilizada para classificar sintomas clínicos de NPIQ .....	19
Tabela 2 – Efeito da suplementação com os antioxidantes sobre os marcadores séricos de toxicidade tecidual em animais com neuropatia periférica induzida por paclitaxel .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AL: Ácido lipoico
- ALT: Alanina aminotransferase
- ANOVA: Análise de variância
- BSA: Soro fetal bovino
- CAT: catalase
- DNPH: 2,4 – dinitrofenilhidrazina
- DRG: Gânglio da raiz dorsal (do inglês *dorsal root ganglion*)
- DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERO: Espécies reativas de oxigênio
- ERN: Espécies reativas de nitrogênio
- GPx: Glutathione peroxidase
- GRx: Glutathione reductase
- GSH: Glutathione reduzida
- GSSG: Glutathione oxidada
- GST: Glutathione-S-transferase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio
- Lip-DH: Lipoamida desidrogenase
- MDA: Malonaldeído
- NAC: N-acetilcisteína
- NMBA: N -nitrosoometilbenzilamina
- NPIQ: Neuropatia periférica induzida por quimioterapia
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion superóxido
- OH: Radical hidroxila
- PBS: Tampão fosfato salino
- PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*)
- PTX: Paclitaxel
- SOD: Superóxido dismutase
- TCA: Ácido tricloroacético (do inglês “*trichloroacetic acid*”)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 Aspectos gerais do câncer e o câncer de mama.....	15
1.2 O tratamento do câncer .....	16
1.3 Neuropatia periférica induzida por quimioterapia (NPIQ).....	18
1.4 Espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes.....	21
1.4.1 N-acetilcisteína .....	23
1.4.2 Ácido lipoico .....	24
1.4.3 Vitamina E .....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Animais e condições gerais de experimentação.....	30
4.2 Protocolo de indução tumoral.....	30
4.2.1 Tumor subcutâneo de Ehrlich .....	30
4.3 Protocolo quimioterápico e indução da neuropatia periférica .....	31
4.4 Protocolo antioxidante .....	31
4.5 Testes nociceptivos .....	31
4.5.1 Teste de nocicepção mecânica (Von Frey) .....	31
4.5.2 Sensibilidade ao frio (teste da placa fria).....	32
4.6 Homogeneização e preparo de amostras .....	32
4.7 Marcadores de toxicidade.....	32
4.8 Dosagem proteica.....	33
4.9 Dosagens do perfil de estresse oxidativo .....	34
4.8.1 Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	34
4.8.2 Quantificação de grupamentos sulfidril totais (tiol reduzido).....	34
4.8.3 Quantificação de proteínas carboniladas (carbonil) .....	34
4.10 Análise estatística.....	35

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
5.1 Os tratamentos com NAC, ácido lipoico ou vitamina E melhoram os parâmetros de nocicepção mecânica e térmica ao frio em camundongos tratados com paclitaxel.....	36
5.2 NAC, ácido lipoico e vitamina E não apresentam efeito pró-tumoral em modelo de tumor subcutâneo de Ehrlich.....	37
5.3 A suplementação com antioxidantes diminui os danos oxidativos no fígado induzidos por paclitaxel.....	38
5.4 Marcadores séricos de toxicidade hepática e renal em animais tratados com paclitaxel isolado ou combinado com NAC, ácido lipoico ou vitamina E.....	40
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais do câncer e o câncer de mama

O câncer é definido, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2019), como um conjunto de doenças, as quais têm um crescimento anormal e incontrolável de células que invadem tecidos e órgãos. Esse crescimento anormal pode ocorrer devido a modificações em proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes que estão envolvidos em mecanismos de reparo de DNA, fazendo com que as células desenvolvam alta taxa de proliferação, acumulando mutações e levando à malignização (TYSNES e BJERKVIG, 2007).

Todo esse processo de desenvolvimento da doença é dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão. O processo de iniciação pode ocorrer devido à exposição a agentes carcinogênicos, como toxinas, vírus, radiação e outros, ou até mesmo através do aparecimento espontâneo de genes mutados. Com todas as modificações que ocorrem, a regulação das vias de proliferação celular, sobrevivência e diferenciação ficam alteradas (SIDDIQUI *et al.*, 2015).

Após ocorrer o processo de iniciação, a célula sadia é transformada em maligna num processo longo e gradual, chamado promoção. Essas células malignas se proliferam e se acumulam (INCA, 2019).

O estágio final é conhecido como progressão, visto que as células já sofreram alterações tanto fenotípicas como genéticas e a proliferação celular encontra-se acelerada. Neste momento, as células neoplásicas se multiplicam descontroladamente, infiltram os tecidos adjacentes, fazendo com que apareçam as primeiras manifestações clínicas da doença (SIDDIQUI *et al.*, 2015; LOEB *et al.*, 2003). Além disso, essas células podem desenvolver a capacidade de invadir a circulação sistêmica e linfática e colonizar tecidos distantes, processo conhecido como metástase.

Um dos componentes importantes para o desenvolvimento dessas etapas é a inflamação, visto que células imunes comprometidas (exaustão de células T, por exemplo) atrapalham o processo de reparo tecidual, favorecendo a produção de fatores proangiogênicos e fatores de crescimento. Com isso, ocorre a formação de um microambiente favorável para a proliferação e invasão de células neoplásicas (TYSNES e BJERKVIG, 2007).

Um dos tipos de câncer mais comuns em mulheres é o de mama, o qual é uma condição causada pela proliferação acelerada das células da mama, fazendo com que elas se

acumulem e formem um tumor. A severidade vai depender do tamanho do tumor, das suas características moleculares (mutações, ampliações e deleções gênicas), da velocidade com que ele cresce, da ocorrência de sinais de proliferação para outros tecidos (metástase), entre outros fatores.

Esse tipo de câncer, em 2016, foi o terceiro mais incidente, com estimados 1,7 milhão de casos (FITZMAURICE *et al.*, 2018), sendo que a maior parte dos casos foi em mulheres. Ainda em 2016, foi considerada uma das principais causas de mortalidade por câncer, em ambos os sexos, em todo o mundo (FITZMAURICE *et al.*, 2018).

Os sinais e sintomas variam muito, sendo eles: nódulo ou espessamento da mama, mudança no tamanho, forma ou aparência de um seio, alterações na pele sobre a mama, formação de crostas ou descamação da área pigmentada da pele ao redor do mamilo ou pele da mama. Todas essas alterações, antes mesmo do diagnóstico, podem afetar a qualidade de vida do indivíduo.

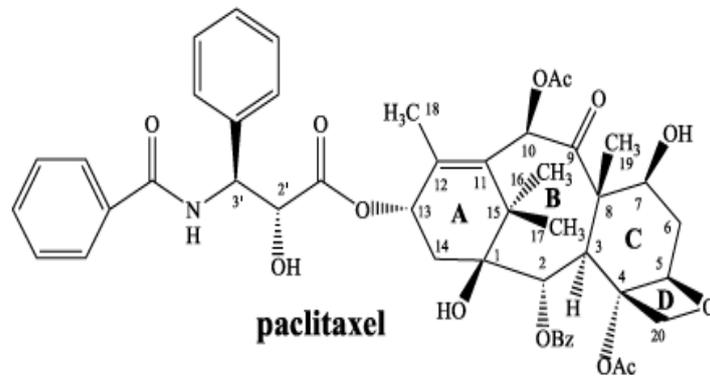
O diagnóstico inclui exame de mama, onde o profissional médico verifica ambos os seios; mamografia, método utilizado para rastreio da doença; ultrassom de mama, para verificar se é uma massa sólida ou líquida; biópsia, onde se retira uma amostra de células para realizar o diagnóstico definitivo, visto que existem vários tipos de tumor.

## **1.2 O tratamento do câncer**

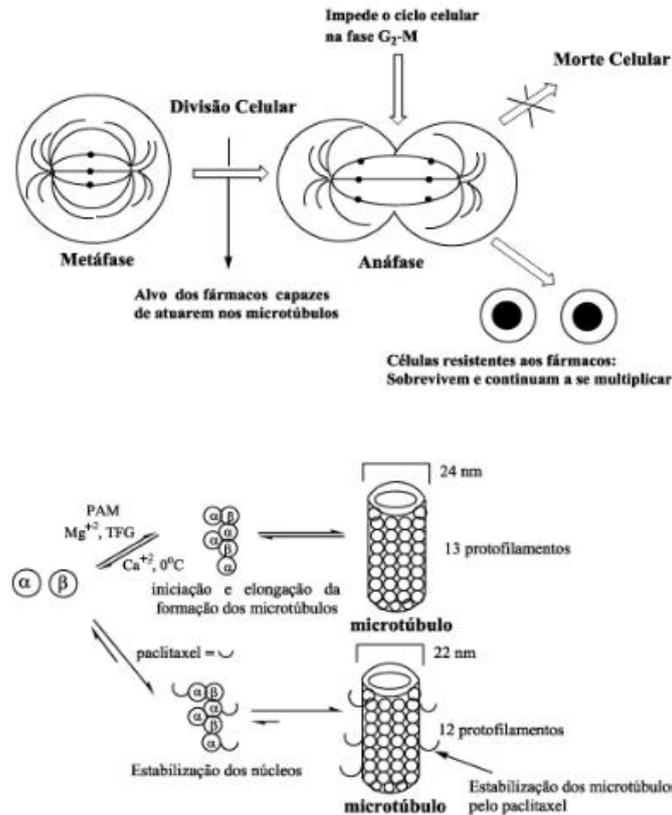
O tratamento da doença vai depender do tipo, local e progressão do tumor. Existem diversas maneiras de tratar, sendo elas: cirurgia, radioterapia, imunoterapia, terapia-alvo e, a mais utilizada em tumores avançados, a quimioterapia (PALUMBO *et al.*, 2013).

Os quimioterápicos convencionais ou agentes citotóxicos foram os primeiros agentes no arsenal para o tratamento do câncer. Hoje em dia, existem diversos fármacos quimioterápicos, os quais são divididos em classes: antimetabólitos, como o metrotexato; antibióticos antitumorais, como a doxorubicina; agentes alquilantes, como oxaliplatina e ciclofosfamida; inibidores da topoisomerase, como o etoposídeo; e, por fim, os estabilizadores de microtúbulos, como o paclitaxel, o qual será o foco desse trabalho (PALUMBO *et al.*, 2013). Os fármacos utilizados no tratamento quimioterápico possuem baixa seletividade celular, afetando tanto as células neoplásicas como as normais, fato este que resulta no aparecimento de efeitos adversos como alopecia, afecções gastrointestinais, náusea, mielossupressão, anemia e disfunções reprodutivas (SCHIRMMACHER, 2019).

Os taxanos, como o paclitaxel, de fórmula química benzoato de (2 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,7 $\beta$ ,10 $\beta$ ,13 $\alpha$ )-4,10-bis(acetiloxi)-13-[[[(2R,3S)-3-(benzoilamino)-2-hidroxi-3-fenilpropanoil]oxi]-1,7-dihidroxi-9-oxo-5,20-epoxitax-11-en-2-ila (Figura 1), são fármacos bem estabelecidos para o tratamento de pacientes com câncer de mama (RIVERA & CIANFROCCA, 2015). O paclitaxel age nos microtúbulos das células, sendo estes envolvidos em diversas funções celulares, como mitose e meiose (DESAI e MITCHISON, 1997; SHARP *et al.*, 2000). A partir da interação com dímeros de tubulina, esse fármaco é capaz de realizar a agregação dos microtúbulos, estabilizando-os, fazendo com que não ocorra a despolimerização. Com isso, ocorre a inibição da reorganização da rede de microtúbulos, a qual é essencial para a mitose celular e transportes intracelulares dependentes de tubulina (Figura 2) (RANG, H.P *et al.*, 2012). Contudo, um efeito adverso muito frequente com o uso do paclitaxel é a neuropatia periférica, a qual parece envolver a alteração do transporte mediado por microtúbulos em neurônios periféricos e que causa um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes (HERSHMAN *et al.*, 2014; ELLIS *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Estrutura química do paclitaxel. A cadeia lateral de éster ativo em C13 se liga aos microtúbulos de uma forma independente de trifosfato de guanossina (GTP) para induzir atividade de citotoxicidade. (M. VINÍCIUS, N. SOUZA, F. CRUZ *et al.*, 2004).



**Figura 2.** Mecanismo de ação do paclitaxel no câncer. O fármaco agrega os microtúbulos, estabilizando-os, fazendo com que não ocorra a despolimerização. Com isso, há inibição da reorganização da rede de microtúbulos, a qual é essencial para a proliferação celular e transportes intracelulares dependentes de tubulina. Adaptado de Sociedade Brasileira de Química, (2014), disponível em: [http://qnint.s bq.org.br/qni/popup\\_visualizarMolecula.php?id=dqfxTPkXV778XYbxsf-pyXzVueq-0EAQnH8sYXb5TdVvk4UyEud9a-dYZt7K392r0OuskewW0fz1uRaS2nf4rdQ](http://qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=dqfxTPkXV778XYbxsf-pyXzVueq-0EAQnH8sYXb5TdVvk4UyEud9a-dYZt7K392r0OuskewW0fz1uRaS2nf4rdQ)==>. Acesso em: 20 abr. 2019.

### 1.3 Neuropatia periférica induzida por quimioterapia (NPIQ)

A NPIQ é definida como uma síndrome neurológica que acontece com o uso de determinados quimioterápicos, dentre eles o paclitaxel (D. SIMÃO, M., M. MURAD, C., *et al.*, 2015). Visto que são estimados 17 milhões de novos casos de câncer até 2020, é preocupante o aumento de casos de NPIQ. Esse efeito não só afeta a qualidade de vida, como pode ocasionar a desistência do tratamento, tanto quanto gerar atrasos de protocolo os quais favorecem o surgimento de resistência ao quimioterápico e afetam a eficácia terapêutica (SMITH *et al.*, 2013). Adicionalmente, cerca de 30% a 40% dos pacientes submetidos a algum tipo de quimioterapia desenvolvem NPIQ e apresentam sintomas de dor e distúrbios sensoriais (ARETI, A., *et al.*, 2014).

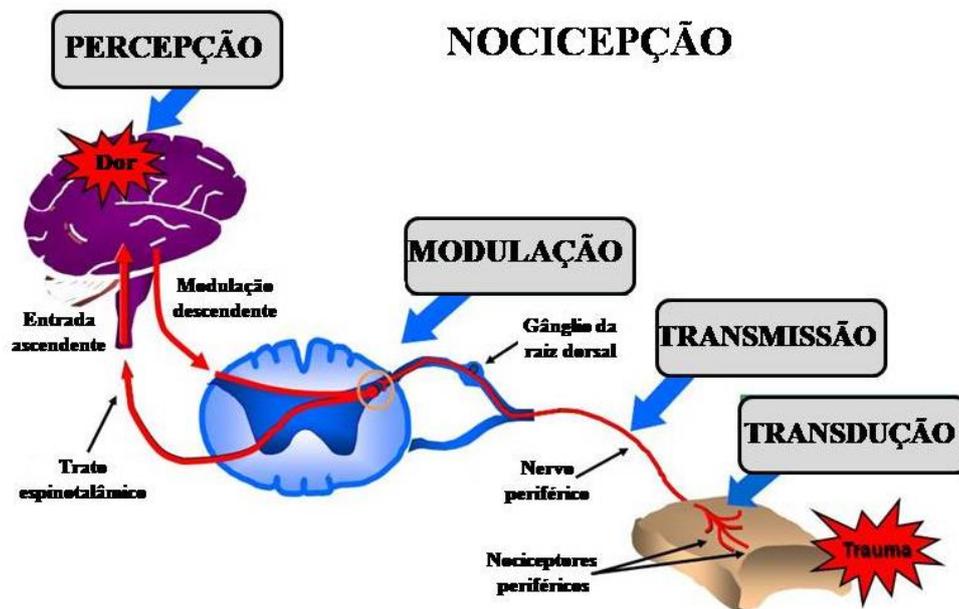
A alta taxa de sucesso do tratamento do câncer levou a um aumento da sobrevivência dos pacientes. Assim, o número de indivíduos que já tiveram câncer e que sofrem de condições de dor neuropática está aumentando também. No geral, cerca de 68% dos pacientes que recebem quimioterapia desenvolvem neuropatia no primeiro mês de tratamento (SERETNY *et al.*, 2014).

Os sintomas relatados por indivíduos com NPIQ variam muito, sendo os mais comuns a sensação de formigamento, dor nos braços tipo queimação, alodinia ao frio, parestesia e dormência em mãos e pés. Na clínica, observa-se que os quimioterápicos que mais causam NPIQ são os compostos da platina (oxaliplatina), taxanos (paclitaxel e docetaxel), alcaloides da vinca (vincristina e vinblastina) e bortezomibe, pois parecem afetar o sistema nervoso periférico (ARETI, A., *et al.*, 2014). Como os sintomas relatados são subjetivos, visto que a dor, principalmente, é “uma experiência sensorial ou emocional desagradável associada à lesão tecidual, real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (IASP), um método de escalas é utilizado para classificar os sintomas clínicos e ajudar no diagnóstico de NPIQ. A Tabela 1, representada abaixo e adaptada de Gutiérrez e colaboradores (2010), é um exemplo do método utilizado.

**Tabela 1.** Tabela da escala utilizada para classificar sintomas clínicos de NPIQ. Adaptado de Gutiérrez e colaboradores (2010).

SCORES	0	1	2	3	4
<b>Sintomas sensoriais</b>	Ausente	Limitados aos dedos das mãos ou pés	Estendem-se até o tornozelo ou punho	Estendem-se ao joelho ou cotovelo	Acima do joelho/cotovelo ou perda de função
<b>Sintomas motores</b>	Ausente	Dificuldade leve	Dificuldade moderada	Requer assistência	Paralisia
<b>Sintomas autonômicos</b>	0	1	2	3	4
<b>Sensibilidade ao pino</b>	Normal	Reduzido nos dedos das mãos/pés	Reduzido até o pulso/tornozelo	Reduzido até o cotovelo/joelho	Reduzido acima do cotovelo/joelho
<b>Sensibilidade à vibração</b>	Normal	Reduzido nos dedos das mãos/pés	Reduzido até o pulso/tornozelo	Reduzido até o cotovelo/joelho	Reduzido acima do cotovelo/joelho
<b>Força</b>	Normal	Fraqueza leve	Fraqueza moderada	Fraqueza severa	Paralisia
<b>Redução do tempo de desocclusão</b>	Normal	Reflexo do tornozelo reduzido	Reflexo do tornozelo ausente	Reflexo do tornozelo ausente, outros reduzidos	Reflexos ausentes

A nocicepção é um processo complexo, o qual é dividido em três etapas: transdução, transmissão e modulação. Essas etapas se iniciam como resposta a um estímulo nocivo externo. Assim, na via ascendente, um neurônio nociceptor periférico (pseudounipolar) identifica o sinal, seja ele térmico, mecânico ou químico e, através de impulsos elétricos repassa a informação para o via neurônio aferente de segunda ordem, ascendendo ao tálamo via trato espinotalâmico, seguindo para o córtex somatossensorial (GOTTSCHALK, A., *et al.*, 2001). Esta via ascendente é regulada por projeções descendentes do tronco cerebral, que promovem modulação do sinal ascendente através de interações sinápticas no corno dorsal da medula espinhal, envolvendo mediadores como o GABA e opioides endógenos. O mecanismo básico da nocicepção está demonstrado na Figura 3.



**Figura 3.** Mecanismo da nocicepção. Adaptada de GOTTSCHALK, A., *et al.*, 2001.

A degeneração dos neurônios periféricos pode ser consequência da falha no sistema de defesa antioxidante, ou por uma alteração na função dos microtúbulos, ativação de canais iônicos, apoptose, entre outros fatores. O estresse oxidativo é considerado um dos principais responsáveis pelos danos neuronais em diferentes modelos de neuropatias, como neuropatia diabética e a NPIQ (ARETI, A., *et al.*, 2014).

Alguns estudos demonstram que a apoptose resultante do desbalanço redox induzida por paclitaxel pode ser devida à liberação de citocromo c e à desregulação de  $Ca^{2+}$  através da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (S.J.L. FLATTERS, G.J. BENNETT., 2006; G. MELLI., *et al.*, 2008). Além disso, autores relatam que a administração

crônica de paclitaxel em animais pode induzir danos severos em nervos periféricos (PERSOHN., *et al.*, 2005).

A NPIQ não tem um tratamento bem estabelecido, normalmente é tratada fazendo uso “*off label*” de gabapentina e antidepressivos como a duloxetina (SMITH *et al.*, 2013). Entretanto, a eficácia destes tratamentos não é totalmente comprovada em neuropatia induzida por quimioterápicos, dado que tal uso é clinicamente fundamentado em dados obtidos outras neuropatias, como a neuropatia diabética (QUASTHOFF e HARTUNG, 2002). Assim, como vários estudos demonstram que a neuropatia pode estar relacionada ao estresse oxidativo, esse trabalho visa demonstrar o efeito do tratamento com antioxidantes na neuropatia periférica induzida pelo paclitaxel.

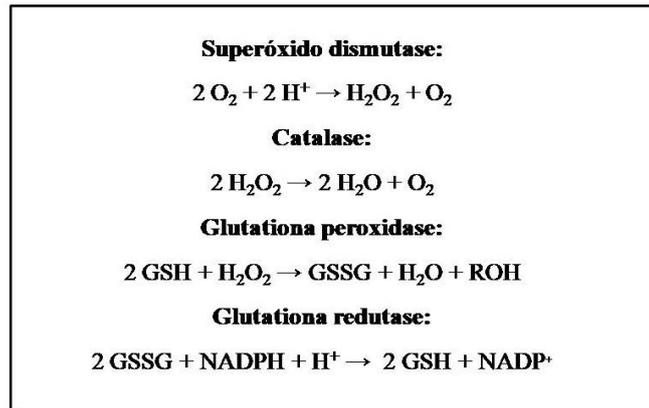
#### **1.4 Espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes**

A respiração celular é um processo de extrema importância realizado através de organelas que estão presentes somente em células eucarióticas, as mitocôndrias. Esse processo se dá pela oxidação de ácidos graxos e glicose, principalmente. A respiração celular gera também radicais livres, que são moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados em suas órbitas externas. São chamados também de espécies reativas, pois o desemparelhamento de elétrons faz com que se tornem moléculas instáveis, com meia-vida curta e que são capazes de reagir com compostos que estão próximos de sua órbita, ocasionando reações de óxido redução (J. FRUEHAUF, F. MEYSKENS, 2007).

Além das espécies oxidantes, há moléculas antioxidantes, as quais são responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres. Essas moléculas podem ser endógenas ou exógenas. As primeiras são produzidas pelo próprio organismo e são divididas em enzimáticas, como a superóxido dismutase (SOD) e não enzimáticas, como o ácido lipoico e GSH (WILLCOX *et al.*, 2004). As segundas são obtidas através da dieta, ou seja, não são produzidas pelo organismo, entre elas está a vitamina E.

Em condições normais, há um equilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes, visto que o balanço redox é importante na regulação das vias de sinalização, como a atividade de quinases e fosfatases (J. FRUEHAUF, F. MEYSKENS, 2007). A superóxido dismutase (SOD), uma das principais moléculas antioxidantes, catalisa a conversão de radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual pode ser convertido em água pela catalase ou glutathiona peroxidase (GPx) acoplada à glutathiona redutase (GR) (Figura 4).

Porém, quando há um desequilíbrio nesse processo, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) pode sobrecarregar a capacidade antioxidante celular, podendo causar danos ao DNA e outras disfunções celulares através da reação com biomoléculas, como lipoperoxidação (dano causado em lipídeos), carbonilação e alterações em resíduos tiólicos (ambos são danos causados em proteínas), gerando um quadro de estresse oxidativo (FIDANBOYLU, GRIFFITHS, & FLATTERS, 2011).



**Figura 4.** Representação esquemática das reações do sistema antioxidante enzimático. Adaptada de L. BARBOSA, M. MEDEIROS., *et al.*, 2006.

Sabe-se que os nervos de mamíferos são mais suscetíveis ao estresse oxidativo devido ao seu alto conteúdo de fosfolípideos e ao axoplasma rico em mitocôndrias (ARETI, A., *et al.*, 2014). As membranas celulares são compostas por grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, tornando-as um dos componentes mais susceptíveis à ação das ERO. A peroxidação lipídica descontrolada é um das principais fontes de produtos citotóxicos, como os aldeídos, que podem desempenhar atividades mutagênicas (SEIFRIED *et al.*, 2007).

Além dos danos causados às membranas, podem ocorrer alterações em proteínas devido à ação das ERO, fazendo com que suas funções fiquem prejudicadas (LEVINE *et al.*, 1990). A mais comum é a carbonilação, que resulta na formação de grupamentos carbonila, como cetonas e aldeídos, podendo causar agregação das proteínas e inibição do proteossoma PIZZIMENTI *et al.*, 2013).

Alguns estudos mostraram que pode haver comprometimento estrutural e funcional causado por quimioterápicos, aumentando a produção de radicais livres pelas mitocôndrias. O estresse oxidativo gerado causa danos físicos aos neurônios por desmielinização, disfunção mitocondrial, dano microtubular e apoptose (ARETI, A., *et al.*, 2014).

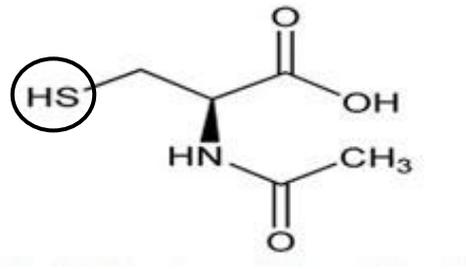
Além do mecanismo clássico inibidor de tubulina do paclitaxel, animais com neuropatia periférica induzida por paclitaxel apresentam danos em mitocôndrias, os quais estão frequentemente relacionados ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (FIDANBOYLU, GRIFFITHS, & FLATTERS, 2011). Com isso, o anseio de investigar o possível envolvimento do estresse oxidativo na NPIQ aumentou (ARETI *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstraram que a administração de fenil N-terc-butilnitrona reduz a alodinia mecânica na dor neuropática induzida por paclitaxel em ratos (KIM *et al.*, 2010), o que pode ser devido a sua capacidade de retirar radicais livres.

O presente trabalho trará dados relativos ao tratamento com o paclitaxel e o uso concomitante de diferentes antioxidantes (N-acetilcisteína, ácido lipoico e vitamina E) em modelo animal, pois há evidências de que o mecanismo de desenvolvimento da NPIQ está relacionado ao dano mitocondrial e um quadro de estresse oxidativo (HERSHMAN *et al.*, 2014).

#### **1.4.1 N-acetilcisteína**

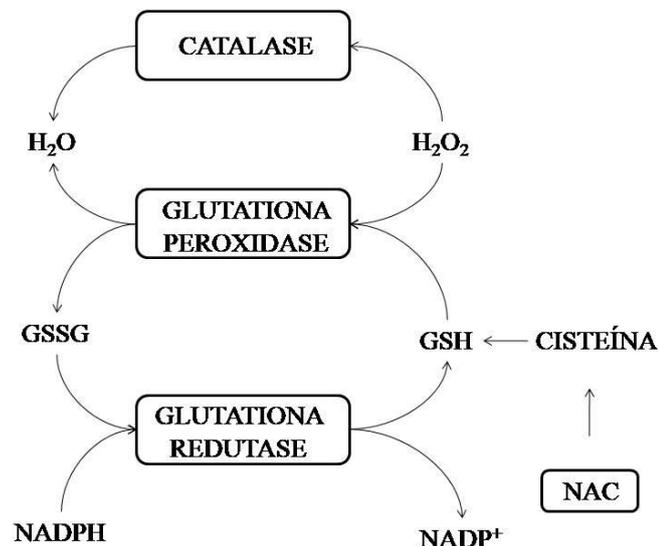
A N-acetilcisteína (NAC) é um pró-fármaco, precursor da cisteína, que está no mercado há décadas devido ao seu potencial como agente mucolítico e também no tratamento da intoxicação por acetaminofeno (paracetamol) (DHOUIB, I.E, JALLOULI, M, *et al.*, 2016; SAMUNI, Y, *et al.*, 2013). Além disso, a NAC também é precursora da glutatona (GSH), uma molécula antioxidante importante presente em nosso organismo. Com isso, alguns estudos demonstram que o papel benéfico da NAC pode estar associado às suas propriedades antioxidantes, visto que é capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio, ajudando no balanço redox das células (HORST, A., *et al.*, 2017).

A estrutura química dessa molécula possui um grupamento tiol (SH) (Figura 5) que garante estabilidade e resistência, visto que é um grupo que se oxida facilmente fazendo com que ocorra a formação de uma ponte dissulfeto covalente (FISHBANE, S., *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Estrutura química da NAC. Em destaque o grupamento tiol da molécula. (FISHBANE, S., *et al.*, 2004)

Como já foi dito anteriormente, a NAC é uma molécula precursora de GSH. Sendo assim, é indiretamente um protetor de componentes celulares, bem como ajuda a diminuir o estresse oxidativo. O ciclo redox da GSH está representado na Figura 6.



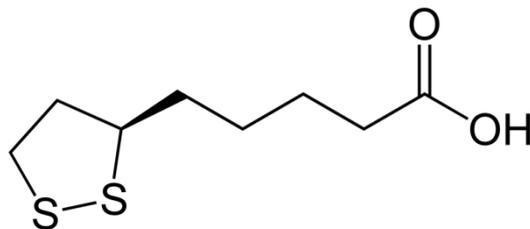
**Figura 6.** Representação esquemática do sistema antioxidante da glutationa. Adaptada de WU, G., *et al.*, 2004.

O mecanismo de ação da NAC ainda não é bem estabelecido, mas alguns estudos demonstraram que pode ajudar a prevenir alodinia induzida por paclitaxel (SEKIGUCHI, F., *et al.*, 2018); que parece ajudar a normalizar o estado oxidativo da medula espinhal devido aos seus efeitos antioxidantes (HORST, A., *et al.*, 2017) e que pode ser capaz de produzir efeito antitumoral em alguns tipos de câncer, induzindo apoptose (CAI *et al.*, 1999).

Com isso, o uso da NAC parece promissor, porém são necessários ainda mais estudos com um número maior de indivíduos participantes (SMITH *et al.*, 2007).

### 1.4.2 Ácido lipoico

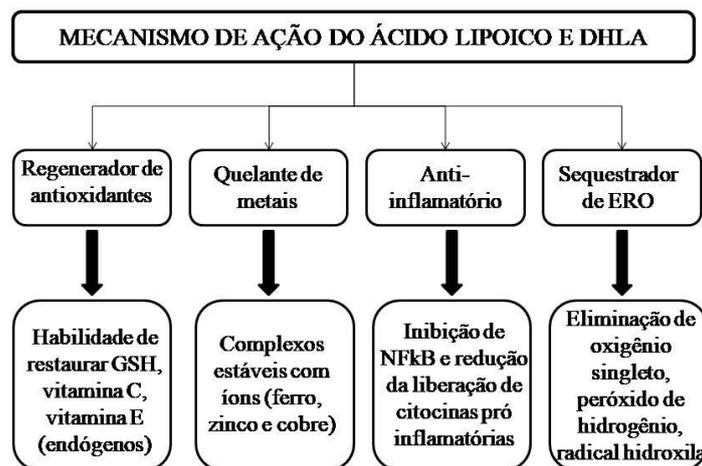
O ácido lipoico é ligado ao grupo amino de resíduos de lisina de forma covalente, exercendo a função de coenzima em diversas funções tanto metabólicas como antioxidantes no organismo. Está envolvido no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos, e como antioxidante é capaz de eliminar vários radicais livres. Supõe-se que a síntese dessa substância acontece nas mitocôndrias (BILSKA, A., WLODEK, L., 2005). Essa molécula foi isolada de fígado de boi em 1950 e após vários anos sua estrutura química foi confirmada, a qual contém um carbono assimétrico que faz com que seja um composto ativo (Figura 7). Seu nome químico é o ácido 6,8-ditio-octanóico (BILSKA, A., WLODEK, L., 2005).



**Figura 7.** Estrutura química do ácido lipoico. Adaptada de BILSKA, A., WLODEK, L., 2005.

O ácido lipoico é capaz de catalisar a descarboxilação oxidativa de  $\alpha$ -ceto-glutarato e piruvato. Além disso, exerce função como antioxidante extinguindo as ERO e quelante de metais. Essa substância também é chamada de antioxidante dos antioxidantes devido a sua capacidade de regenerar outros antioxidantes, como vitamina C e E. Diversos estudos mostram que seu uso pode auxiliar no tratamento de muitas doenças, como o câncer e doenças neurodegenerativas (GORAÇA, A., *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação do ácido lipoico acontece através da sua ligação com grupamentos acila, e posteriormente ocorre a transferência de uma parte do complexo enzimático para outro. Assim, ocorre a redução do ácido lipoico a ácido dihidrolipoico (DHLA), o qual se reoxida, formando NADH (AMBROSI *et al.*, 2018). Além da função antioxidante, o ácido lipoico exerce outras funções que estão resumidas na Figura 8.

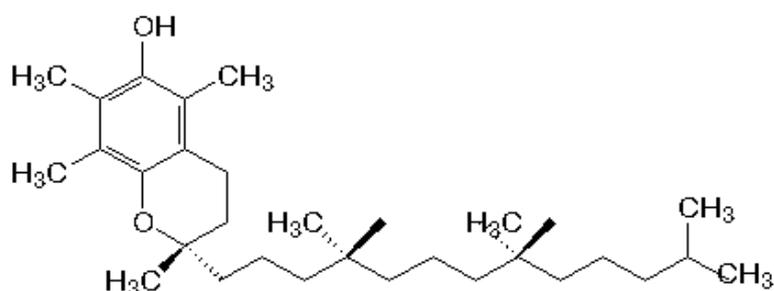


**Figura 8.** Possíveis mecanismos de ação do ácido lipoico e ácido dihidrolipoico (DHLA). Adaptada de AMBROSI *et al.*, 2018.

Ainda, alguns estudos demonstram que o ácido lipoico pode apresentar atividade antitumoral em determinados tipos de câncer (UNIT, 2005). Sendo assim, é uma substância de interesse para esse trabalho, visto que possui baixa toxicidade e evidências de que pode ser benéfica no tratamento conjunto a quimioterapia.

### 1.4.3 Vitamina E

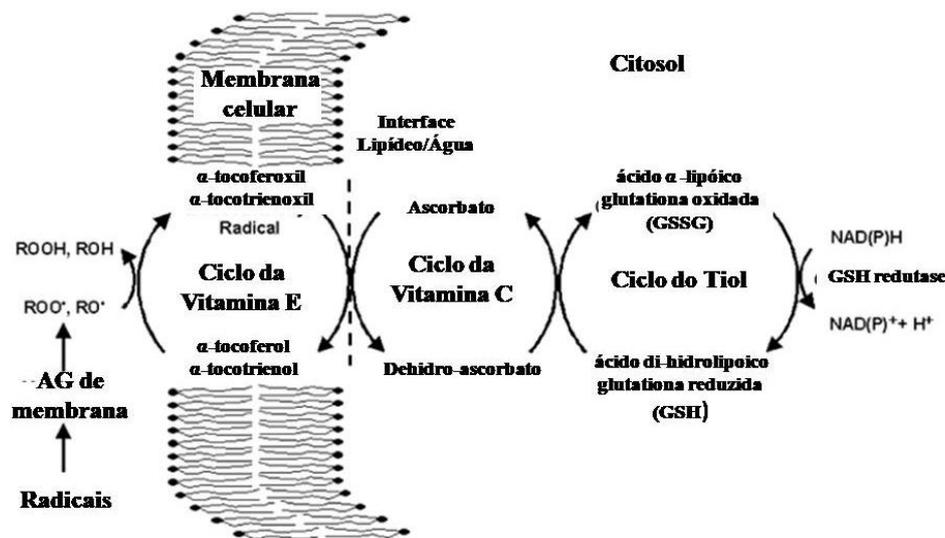
A vitamina E é uma grande família de compostos lipossolúveis. Sua estrutura química é caracterizada pela presença de um anel cromanol e uma cadeia lateral. Essa família é dividida em tocoferóis e tocotrienóis, ambas as categorias possuem quatro substâncias, totalizando oito isômeros. O que os diferencia é a quantidade e a posição dos grupamentos metila presentes no anel cromanol, e para diferenciá-los são chamados de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$  (DAS GUPTA *et al.*, 2015) Nesse trabalho, o foco é o  $\alpha$ -tocoferol, visto que é o principal tocoferol do plasma e dos tecidos. Sua estrutura química está representada na Figura 9.



**Figura 9.** Estrutura química do  $\alpha$ -tocoferol. Adaptada de DAS GUPTA *et al.*, 2015.

A vitamina E é essencial para equilibrar as reações de óxido-redução nos tecidos. Além disso, é uma substância bem tolerada via oral pelos humanos e não é tóxica, apesar de que podem aparecer alguns sintomas após sua ingestão, como fadiga, dermatite e sintomas gastrointestinais (CONSTANTINO, C., *et al.*, 2008).

Analisando a estrutura química, percebe-se que a molécula é bastante lipossolúvel, fazendo com que tenha afinidade pelas membranas celulares, onde ocorrem principalmente as reações e com isso é capaz de prevenir a lipoperoxidação. O mecanismo de ação da vitamina E está resumido na figura 10.



**Figura 10.** Mecanismo de ação da vitamina E. AG: ácidos graxos. Adaptada de VAN MEETEREN, M., *et al.*, 2005.

Alguns estudos sugerem que a ingestão de vitamina E proveniente da dieta pode reduzir o risco de câncer, baseado em suas propriedades antioxidantes. (DAS GUPTA *et al.*, 2015). Outros sugerem que são necessários mais estudos sobre a atividade dos tocoferóis no câncer, pois testes em grande escala em humanos forneceram conclusões inconsistentes (ANDREAS, A. ARGYRIOU, MD., *et al.*, 2006).

Segundo Constantinou (2008), existem evidências de que a vitamina E possui atividade anticarcinogênica e pode ser uma substância candidata ao tratamento coadjuvante do câncer. Relata ainda sobre um estudo que ocorreu na região do Mediterrâneo, onde indivíduos que consumiam dietas ricas em vitamina E tinham um risco menor de surgimento de câncer de cólon comparados às pessoas no norte da Europa e Estados Unidos da América.

## 2. JUSTIFICATIVA

Não há um tratamento bem estabelecido e amplamente eficaz para a neuropatia periférica induzida por quimioterapia (NPIQ), a qual responde pobremente aos analgésicos como paracetamol, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), opioides ou fármacos como a duloxetina e pregabalina (SCHESTATSKY & NASCIMENTO, 2009). Além da ausência de terapia com eficácia comprovada, há negligência médica em relação ao assunto e, muitas vezes, ocorre atraso na terapia quimioterápica, podendo levar à resistência e falha terapêutica. Os mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento da NPIQ não são bem esclarecidos, porém já existem evidências de que o dano mitocondrial e o desenvolvimento de estresse oxidativo estão envolvidos. Além disso, muitos trabalhos falham por não testar os fármacos-teste na presença de implante tumoral. Em 2014, foi publicado um Guia para Prevenção e Manejo da NPIQ pela American Society of Clinical Oncology (ASCO), enfatizando a necessidade de mais estudos referentes ao tema (HERSHMAN *et al.*, 2014). Sendo assim, a ideia deste trabalho foi testar substâncias antioxidantes na prevenção da neuropatia periférica induzida por paclitaxel, bem como sua toxicidade, em modelo animal.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito dos antioxidantes N-acetilcisteína, ácido lipoico e vitamina E na neuropatia periférica e toxicidade do paclitaxel em modelo animal.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos do tratamento com antioxidantes sobre a hiperalgesia mecânica e alodinia ao frio induzidas pelo paclitaxel;
- Realizar análises bioquímicas e enzimáticas para avaliar parâmetros de estresse oxidativo;
- Realizar análises bioquímicas sobre os marcadores séricos de toxicidade nos animais sob tratamento com paclitaxel e antioxidantes;
- Avaliar o impacto do tratamento com antioxidantes na eficácia antitumoral do paclitaxel em modelos de tumor subcutâneo de Ehrlich em camundongos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos aqui apresentados foram submetidos à avaliação e aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) antes do início dos experimentos, sob o protocolo de número 3722260417.

### 4.1 Animais e condições gerais de experimentação

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, os quais pesavam entre 35 e 45g, com idade de 4 a 8 semanas. Os animais foram obtidos através do Biotério Central da UFSC e foram mantidos de acordo com os princípios éticos preconizados no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (The Guide)*, evitando a dor e sofrimento animal ao longo dos estudos.

Durante o período de experimentação, cada grupo experimental foi alocado em uma gaiola. No término dos experimentos os animais foram submetidos à eutanásia por meio de anestesia com cetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, seguida por exsanguinação por/após punção cardíaca.

O cálculo do tamanho amostral foi realizado de acordo com Callegari-Jacques (Bioestatística, princípio e aplicações, 2004), e calculado com base nos dados de média e desvio padrão do parâmetro principal da análise obtido de estudos prévios com o mesmo modelo. O número obtido, usando o teste de Von Frey como teste principal, foi de 6 animais por grupo.

### 4.2 Protocolo de indução tumoral

#### 4.2.1 Tumor ortotópico de Ehrlich

Para o modelo de implante mamário de tumor de Ehrlich, 1 a  $2 \times 10^6$  células suspensas em 100 uL de salina estéril foram inoculadas subcutaneamente na região das glândulas mamárias inferiores direita de camundongos *Swiss* fêmeas, utilizando uma pequena incisão inguinal em animais sob anestesia com isoflurano/O<sub>2</sub>. Após a inoculação, os tumores foram palpáveis em um período de cinco a dez dias. Uma vez que um tumor palpável foi detectado, os tratamentos com paclitaxel e os antioxidantes teste foram iniciados. Foi utilizado um caliper para medir os diâmetros tumorais ao longo de 15 dias e o volume tumoral foi

calculado através da seguinte fórmula:  $\text{volume (mm}^3) = 4\pi/3 \times a^2 \times (b/2)$  (MIZUNO *et al.*, 1999; GALUPPO *et al.*, 2016), onde 'a' representa o menor diâmetro tumoral e 'b' o maior diâmetro, ambas as medidas em milímetros.

### **4.3 Protocolo quimioterápico e indução da neuropatia periférica**

A neuropatia periférica foi induzida através da administração intraperitoneal de 200 uL/sítio de paclitaxel 5 mg/kg (Glenmark Farmacêutica Ltda – Argentina), diluído em salina, em dias alternados, durante 14 dias. O quimioterápico foi mantido refrigerado a 4°C, seguindo as orientações do fabricante. A dose de 5 mg/kg seguiu o estudo de Kamei e colaboradores (2017). A droga era diluída e preparada apenas no dia da administração. Para o grupo veículo, foi utilizado soro glicosado.

### **4.4 Protocolo antioxidante**

Os antioxidantes utilizados foram N-acetilcisteína, ácido lipoico e vitamina E, todos na dose de 50 mg/kg, e foram obtidos da Essentia Pharma – Florianópolis - SC. O armazenamento era feito em freezer com temperatura de -20°C.

A administração foi realizada por via oral (500 uL/dose), através de gavagem, diariamente, ao longo dos 14 dias de tratamento com paclitaxel. Para isso, a NAC e o ácido lipoico eram dissolvidos em PBS 50 mM, com pH 7,0. Após, era adicionado hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) para neutralizar completamente o pH e resultar em solubilização completa da droga. A vitamina E era diluída em óleo de gergelim, devido ao seu caráter lipofílico. Para o grupo veículo, foi utilizado PBS 50 mM com pH 7,0.

### **4.5 Testes nociceptivos**

Nos dias da realização dos testes (Von Frey e placa fria), os animais foram pré-ambientados nas plataformas de teste por 30 minutos antes do início do experimento.

#### **4.5.1 Teste de nocicepção mecânica (Von Frey)**

Esse teste tem como objetivo avaliar os limiares de nocicepção mecânica através do método *up and down* de Von Frey (DIXON, 1980; CHAPLAN *et al.*, 1994). Os animais são colocados em câmaras de acrílico, individualmente, e o assoalho da plataforma é gradeado para que se tenha acesso às patas dos animais. O experimento inicia avaliando a resposta a um determinado filamento (0,16 g) e, caso não haja resposta, o próximo filamento a ser testado é de uma força maior (0,4 g); se houver resposta, um filamento de força inferior (0,07 g) é testado. Esse processo foi realizado até que pelo menos quatro leituras fossem obtidas após a primeira mudança de direção (DIXON, 1980). Os resultados são expressos em limiar de respostas positivas de 50%, e calculadas de acordo com a fórmula apresentada por Dixon (1980). Para análise estatística (mas não para representação gráfica), os dados foram normalizados por transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ) e aplicado o teste ANOVA de duas vias.

#### **4.5.2 Sensibilidade ao frio (Teste da placa fria)**

A sensibilidade ao frio é avaliada através do teste da placa fria, adaptado de JASMIN *et al.* (1998). Foi utilizado um bloco de gelo envolto por uma superfície plana plástica, medindo 22 cm x 16 cm de superfície e 3 cm de altura, com temperatura superficial de  $3 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . O animal foi posicionado no centro da placa e as elevações de patas foram contadas no intervalo de 1 minuto.

#### **4.6 Homogeneização e preparo de amostras**

Após a eutanásia, foram coletados fígado, rim e coração dos animais. Os órgãos foram homogeneizados através de um homogeneizador de tecidos (X-1020 Turrax) para posterior análise dos marcadores de dano oxidativo. Foram preparadas duas alíquotas de cada homogenato, os quais, posteriormente, foram armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.7 Marcadores de toxicidade**

O sangue dos animais foi coletado, armazenado em tubo contendo 60  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,1 M e centrifugado a 3.000 g por 15 minutos. Feito isso, o plasma foi coletado para

quantificar os marcadores séricos de toxicidade hepática e renal, alanina aminotransferase (ALT) e creatinina, respectivamente.

A atividade enzimática da ALT foi quantificada através do kit ALT/GPT Liquiform (Labtest Diagnóstica, Brasil), a qual se baseia no fato de que a enzima catalisa a transferência do grupamento amina da alanina para o  $\alpha$ -cetoglutarato, gerando glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato pela enzima lactato desidrogenase e a coenzima NADH é oxidada a NAD<sup>+</sup>. Esta é capaz de ser detectada fotometricamente em comprimento de onda 340 nm. Os resultados foram apresentados em unidades de ALT por litro (U/L).

A quantificação de creatinina foi realizada através do kit Creatinina K (Labtest Diagnóstica, Brasil). O teste tem como princípio a reação entre a creatinina e picrato alcalino, a qual forma um complexo avermelhado. Inicialmente, adiciona-se 200  $\mu$ L de amostra ou padrão e 400  $\mu$ L de ácido pícrico em tubos de 1,5 mL, seguido da centrifugação por 10 minutos para desproteinização. Após, o sobrenadante é misturado com NaOH e ácido pícrico (picrato alcalino) e transferido para uma microplaca de 96 poços. A absorbância é monitorada em comprimento de onda de 510 nm em 30 e 90 segundos. Os resultados são calculados de acordo com o fabricante e apresentados em mg/dL.

#### 4.8 Dosagem proteica

Essa dosagem foi realizada através do método de Lowry para determinar a quantidade de proteína necessária para os testes de dosagem do perfil de estresse oxidativo. O método utilizado se baseia na mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (Folin 2N), ocorrendo uma reação de redução na presença de proteínas em solução alcalina (Reativo C). Esse reativo é preparado misturando-se, em ordem, o Reativo B1 (sulfato de cobre - CuSO<sub>4</sub> 1%) + Reativo B2 (Tartarato duplo de sódio e potássio) + Reativo A (hidróxido de sódio e carbonato de sódio 2%), na presença do cobre (Cu<sup>2+</sup>), o qual é um catalisador, produzindo um composto com absorção em 700 nm. A reação final produz uma coloração azul, correspondendo à quantidade de proteína presente na amostra. O padrão utilizado foi BSA 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L (*bovine serum albumin*) e as amostras foram diluídas com PBS 10mM em 60 vezes para o fígado e 30 vezes para coração e rim. Por fim, os valores foram calculados e expressos em  $\mu$ g/ $\mu$ L de proteína por poço.

## 4.9 Dosagens do perfil de estresse oxidativo

### 4.9.1 Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances*)

Substâncias que são reativas ao ácido tiobarbitúrico são formadas como um subproduto da peroxidação lipídica, as quais podem ser detectadas através do ensaio do TBARS, usando o ácido tiobarbitúrico como reagente. Nesta técnica, é possível medir os produtos dos danos produzidos pelo estresse oxidativo, visto que as espécies reativas de oxigênio possuem meia-vida muito curta, tornando-as difíceis de medir diretamente. Através desse ensaio, foram medidos o malondialdeído (MDA) presente na amostra além do MDA gerado a partir de hidroperóxidos de lipídeos pelas condições hidrolíticas da reação. Esse produto é de baixo peso molecular e é formado através da decomposição de certos produtos da peroxidação lipídica primária e secundária. As extremidades aldeídicas dos lipoperóxidos reagem com o TBA 0,67% em meio ácido e, com o aumento da temperatura, ocorre formação das substâncias reativas, as quais foram quantificadas com absorvância de 532 nm. O padrão utilizado foi o MDA 100 nM, e a faixa de proteína utilizada para as amostras foi entre 0,5 e 2 mg por amostra. Os valores foram calculados e expressos em nmol/mg de proteína.

### 4.9.2 Quantificação de grupamentos sulfidril totais (tiol reduzido)

Essa técnica tem como princípio a redução do ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) 10 mM (DTNB ou Reagente de Ellman) com os grupamentos SH das proteínas e outros compostos, como a glutatona. As amostras foram pipetadas com e sem DTNB, adicionando-se, em todos os poços, o tampão forte (ácido bórico 100 mM + EDTA 0,2 mM). Posteriormente, foram incubadas durante uma hora, em temperatura ambiente. Os resultados foram quantificados com absorvância de 412 nm. O padrão utilizado foi a N-acetilcisteína 1 mM e a faixa de proteínas foi entre 30 e 100 µg. Os valores foram calculados e expressos em µmol/mg de proteína.

### 4.9.3 Quantificação de proteínas carboniladas (carbonil)

A carbonilação é um determinado tipo de oxidação proteica que forma cetonas ou aldeídos reativos, os quais podem reagir com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas. A quantidade de hidrazona formada foi quantificada com absorvância de 370 nm. As amostras foram preparadas com uma faixa de proteínas entre 1 e 4 mg. Para cada ponto, foram preparados dois microtubos, sendo um com HCl 2M e o outro com DNPH 10 mM, com posterior incubação de uma hora em temperatura ambiente, passando no vórtex a cada 15 minutos. Ao final da incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% para precipitação das proteínas. Após, as amostras foram centrifugadas três vezes a 13.500 g durante cinco minutos, e a cada vez os pellets foram lavados com 500 µL de etanol/acetato de etila (1:1). Após as lavagens, os pellets foram ressuspensos com 1 mL de guanidina 6M e 200 µL foram transferidos para a placa, realizando a leitura. Os valores foram calculados e expressos em nmol/mg de proteína.

### 4.10 Análise estatística

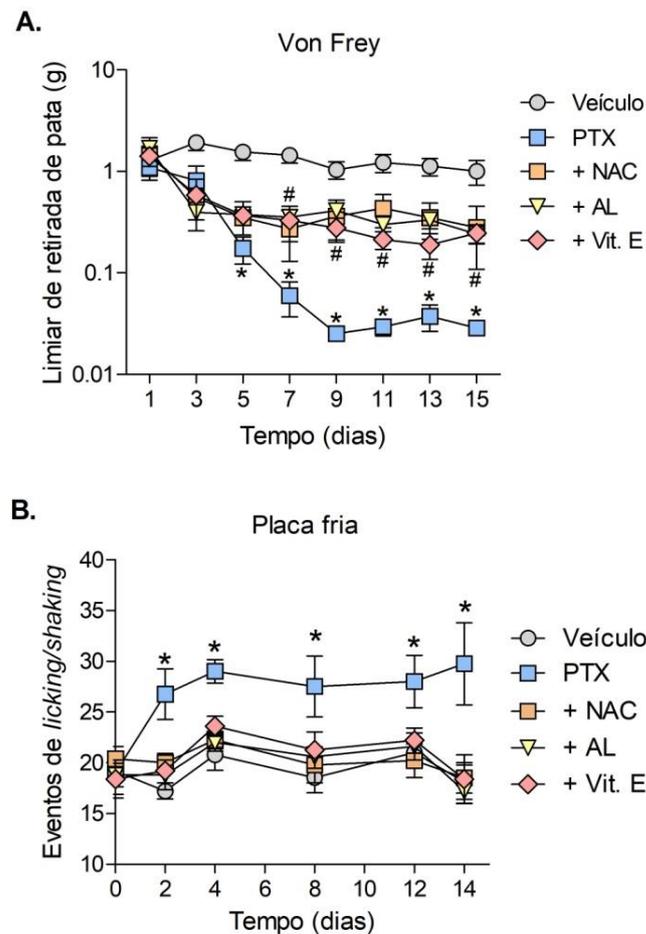
A análise entre vários grupos em condições iguais foi realizada por ANOVA de uma via seguido de Teste de Tukey. Para três ou mais grupos em duas condições diferentes (tempo versus tratamentos, por exemplo), a análise foi realizada através de ANOVA de duas vias seguida de Teste de Bonferroni. No caso do teste de Von Frey, os valores obtidos foram transformados em log<sub>10</sub> e, posteriormente, foram analisados por ANOVA de duas vias. O nível de significância a ser considerado foi de, pelo menos,  $p < 0,05$ , utilizando o software Prisma GraphPad®.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Os tratamentos com NAC, ácido lipoico ou vitamina E melhoram os parâmetros de nocicepção mecânica e térmica ao frio em camundongos tratados com paclitaxel.

Inicialmente, foi feita a caracterização da NPIQ por paclitaxel na dose de 5 mg/kg. Os animais utilizados foram camundongos fêmeas *Swiss* e o fármaco foi administrado a cada 48 horas, durante 14 dias (7 doses). Na Figura 11A é possível observar que a partir do quinto dia de avaliação experimental, ou seja, na terceira dose administrada, o paclitaxel começou a reduzir o limiar de retirada de pata no teste que avalia a nocicepção mecânica através de filamentos, chamado de Von Frey. Além disso, foi possível observar que o número de eventos nociceptivos no ensaio de placa fria começou a aumentar após 48 horas da primeira dose do fármaco (Figura 11B). Ambos os resultados foram obtidos quando comparados aos animais tratados com veículo. Esse efeito foi mantido até o final do experimento.

Ainda analisando a Figura 11A, observamos que a hiperalgesia mecânica foi parcialmente revertida pelo tratamento com os antioxidantes (NAC, ácido lipoico e vitamina E – todos na dose de 50 mg/kg/dia), dado que os valores de nocicepção em grupos tratados com antioxidantes são estatisticamente diferentes tanto do grupo paclitaxel quanto do controle veículo. Com relação à sensibilidade ao frio, a qual foi analisada através do teste de placa fria, o resultado foi diferente, visto que o número de eventos realizados pelos grupos tratados com NAC, ácido lipoico e vitamina E retornou aos níveis do grupo veículo (Figura 11B).

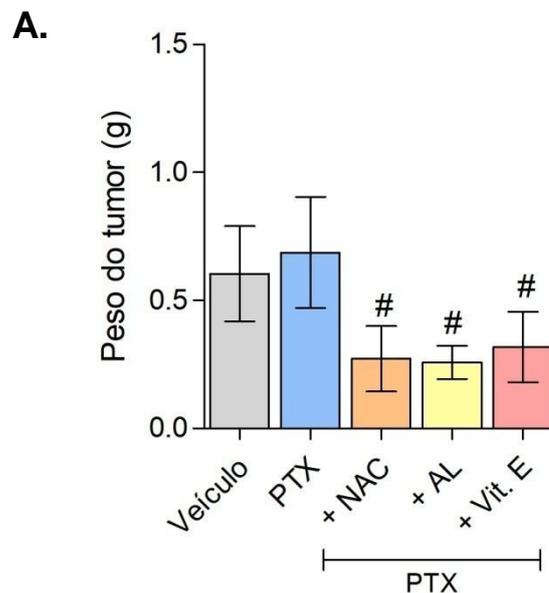


**Figura 11.** Comparação dos limiares de nociceção no tratamento com diferentes antioxidantes em modelo de neuropatia periférica induzida por paclitaxel em camundongos *Swiss*. (A) Alodinia mecânica (Von Frey) e (B) nociceção ao frio (teste de placa fria) em camundongos *Swiss* tratados com paclitaxel (5 mg/kg) em presença de NAC, ácido lipoico (AL) ou vitamina E (50 mg/kg) ao longo de 15 dias de protocolo. \* indica diferença estatística quando comparados ao grupo veículo; # indica diferença estatística quando comparado aos grupos paclitaxel (PTX) e veículo (ANOVA de 2 vias com medidas repetidas, *post hoc* de Bonferroni;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ /grupo).

## 5.2 NAC, ácido lipoico e vitamina E não apresentam efeito pró-tumoral em modelo de tumor subcutâneo de Ehrlich.

O modelo utilizado nesse trabalho foi o de implante subcutâneo de tumor de Ehrlich, porém células utilizadas se mostraram resistentes ao paclitaxel *in vivo*, visto que o crescimento dos tumores não foi reduzido em animais tratados somente com o quimioterápico (Figura 12). Importante enfatizar que a dose de paclitaxel utilizada foi a mesma usada para

induzir alterações nociceptivas. Apesar disso, nos grupos que foram tratados com paclitaxel combinados com NAC, ácido lipoico ou vitamina E apresentaram uma diminuição do tamanho tumoral quando comparados aos grupos veículo e paclitaxel isolado (Figura 12). Sendo assim, analisando esse resultado podemos dizer que, apesar do paclitaxel não ter sido eficaz no modelo utilizado, os antioxidantes foram benéficos em se tratando da redução tumoral, embora outros modelos tumorais sensíveis ao paclitaxel serão necessários para reforçar este resultado.



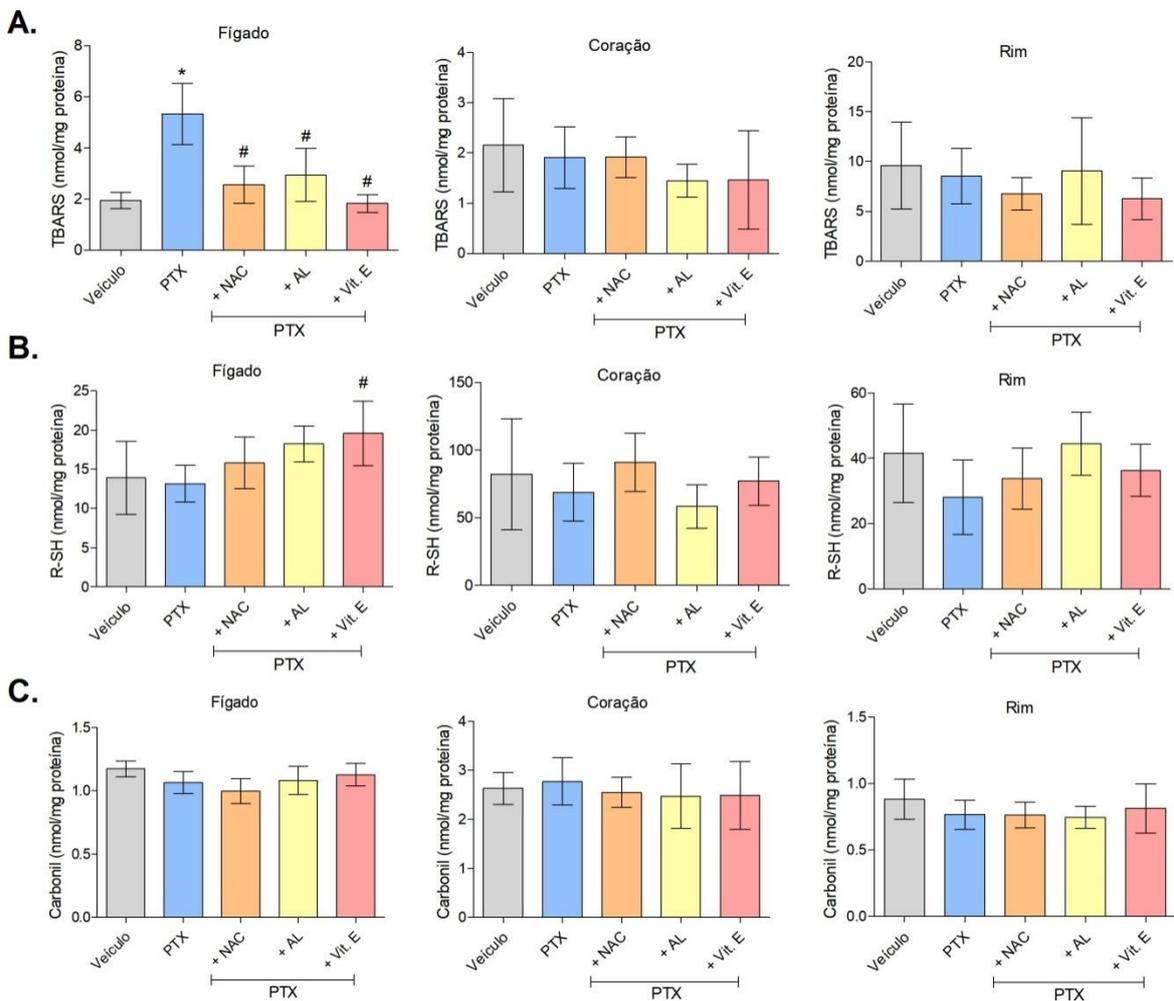
**Figura 12.** Comparação do efeito do tratamento com NAC, ácido lipoico (AL) e vitamina E sobre o desenvolvimento tumoral de Ehrlich em modelo de neuropatia periférica induzida por paclitaxel em camundongos fêmeas *Swiss*. (A) Peso do tumor coletado ao final do experimento. \* indica diferença estatística quando comparados ao grupo veículo; # indica diferença estatística quando comparado aos grupos paclitaxel (PTX) e veículo (ANOVA de 2 vias com medidas repetidas, *post hoc* de Bonferroni;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ /grupo).

### 5.3 A suplementação com antioxidantes diminui os danos oxidativos no fígado induzidos por paclitaxel.

Ao final do modelo de NPIQ por paclitaxel com NAC, ácido lipoico ou vitamina E, coletamos o fígado, rim e coração dos animais para posterior análise do perfil de estresse oxidativo (danos em lipídeos e proteínas), de modo a testar se o paclitaxel induz dano oxidativo e se os antioxidantes, nas doses utilizadas, exercem efeito protetor de fato.

A lipoperoxidação lipídica, analisada através do ensaio de TBARS, aumentou significativamente apenas no fígado dos animais tratados com paclitaxel e não houve alteração no coração e rim dos animais. Adicionalmente, os antioxidantes se mostraram benéficos para o tratamento da NPIQ, visto que foram capazes de atenuar a lipoperoxidação lipídica no fígado (Figura 13A).

Com relação a carbonilação (carbonil) de proteínas e níveis de tiol reduzido (R-SH), não houve diferença significativa no coração nem rim, apenas no fígado de animais tratados com paclitaxel associado à vitamina E. Tais dados estão demonstrados na Figura 13B e Figura 13 C.



**Figura 13.** Efeito da suplementação com NAC, ácido lipoico (AL) e vitamina E sobre marcadores de danos oxidativos em tecidos periféricos de camundongos fêmeas *Swiss* com NPIQ por paclitaxel. (A) TBARS, (B) Sulfidril total/grupos R-SH e (C) Carbonil no fígado, coração e rim de animais veículo, tratados com paclitaxel (5 mg/kg) em presença de NAC, ácido lipoico (AL) ou vitamina E (50 mg/kg) ao longo de 15 dias de protocolo. \* indica diferença estatística quando comparados ao grupo veículo; # indica diferença estatística quando comparado aos grupos paclitaxel (PTX) e veículo (ANOVA de uma via, *post hoc* de Tukey;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ /grupo)

#### 5.4 Marcadores séricos de toxicidade hepática e renal em animais tratados com paclitaxel isolado ou combinado com NAC, ácido lipoico ou vitamina E.

Depois de terminado o protocolo de 15 dias, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado, armazenado em tubo contendo 60 µL de EDTA 0,1 M e centrifugado a 3.000 g por 15 minutos. Feito isso, o plasma foi coletado para quantificar os marcadores séricos de toxicidade hepática e renal, alanina aminotransferase (ALT) e creatinina, respectivamente, através de ensaios colorimétricos.

Como resultados, temos que o tratamento isolado com PTX ou combinado com NAC, AL ou vitamina E não foi capaz de alterar os valores de alanina aminotransferase (ALT) e creatinina, indicando que não houve toxicidade hepática nem renal, respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito da suplementação com os antioxidantes sobre os marcadores séricos de toxicidade tecidual em animais com neuropatia periférica induzida por paclitaxel

MARCADORES SÉRICOS DE TOXICIDADE TECIDUAL	VEÍCULO	PTX	PTX + NAC	PTX + AL	PTX + VIT. E
ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) (U/L)	19,2 ± 9,4	23,1 ± 23,8	13,4 ± 8,1	12,0 ± 5,1	14,8 ± 6,2
CREATININA (mg/dL)	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1

Nesta tabela estão descritos parâmetros metabólicos de camundongos fêmeas *Swiss* divididos em cinco grupos: veículo, tratados com paclitaxel (PTX) 5 mg/kg e paclitaxel combinado com NAC, ácido lipoico (AL) ou vitamina E 50 mg/kg. O soro foi coletado dos animais sem um período de jejum. Resultados estão expressos com a média ± desvio padrão. (ANOVA de uma via, post-hoc de Tukey;  $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A NPIQ é um dos eventos adversos comumente relatados por pacientes que fazem uso do paclitaxel, um quimioterápico bem estabelecido para o tratamento do câncer de mama. Contudo, não existem terapias com eficácia comprovada para tratar a NPIQ. O tratamento na maioria das vezes é feito baseado em outras neuropatias, utilizando duloxetina e pregabalina (SCHESTATSKY & NASCIMENTO, 2009), ou até mesmo paracetamol, anti-inflamatórios não esteroidais e opioides.

O manejo da NPIQ é muito importante, visto que muitas vezes pacientes desistem ou atrasam sua terapia, o que pode levar à falha terapêutica ou resistência posteriormente. Com isso, foi observada uma necessidade de estudos mais aprofundados, não apenas em parâmetros nociceptivos e de dor, mas incluindo testes com fármacos-teste junto com implantes tumoral de modo a eliminar possíveis interferências com a eficácia dos antitumorais (HERSHMAN *et al.*, 2014).

Estudos demonstram que animais que desenvolveram neuropatia periférica induzida por paclitaxel apresentaram danos em mitocôndrias, e, conseqüentemente, aumento na produção de ERO (FIDANBOYLU, GRIFFITHS, & FLATTERS, 2011). Essas espécies reativas são equilibradas por diversos mecanismos de defesa antioxidante, podendo impedir o desenvolvimento de danos celulares (HALLIWELL, 2007).

Assim, esse trabalho teve como objetivo estudar e testar o efeito de substâncias antioxidantes (NAC, ácido lipoico e vitamina E) na prevenção da neuropatia periférica induzida por paclitaxel, visto que já foi demonstrado que a NPIQ pode ser bem relacionada ao estresse oxidativo em neurônios periféricos. Foram avaliados parâmetros nociceptivos mecânicos e térmicos, efeitos sobre o desenvolvimento tumoral e também toxicidade hepática e renal do paclitaxel.

Nossos dados sugerem que os parâmetros de nocicepção mecânica e térmica melhoram quando tratados com NAC, ácido lipoico ou vitamina E na neuropatia periférica induzida por paclitaxel. O modelo utilizado para indução tumoral (tumor de Ehrlich) não foi eficaz em se tratando de avaliar o efeito antitumoral do paclitaxel, visto que os tumores *in vivo* se mostraram resistentes ao quimioterápico. Contudo, foi observado que o uso da NAC, ácido lipoico e vitamina E não foram benéficos para o crescimento tumoral, e até apresentaram um efeito antitumoral na combinação com paclitaxel, indicando que os antioxidantes não alteram a atividade antitumoral. Entretanto, esses dados não nos permitem avaliar se os antioxidantes têm atividade antitumoral *per se*, dados que grupos de animais

tratados apenas com os antioxidantes não foram conduzidos. Modelos como os tumores 4T1 de mama, os quais são sensíveis ao paclitaxel (dados não mostrados) serão realizados para complementar estes dados.

Com relação a toxicidade hepática e renal, analisadas através das atividades da ALT e creatinina, respectivamente, o uso isolado do paclitaxel ou combinado com os antioxidantes não alteraram os valores de referência. Além disso, os antioxidantes foram capazes de ajudar na diminuição dos danos oxidativos, principalmente lipoperoxidação, no fígado. Já no tecido cardíaco e renal esse efeito não foi observado. Os resultados nos mostram também que não houve dano a nível de proteínas (grupos sulfidril totais e proteínas carboniladas).

Ainda há poucos estudos que relacionam o uso da NAC combinado com o paclitaxel, porém alguns autores demonstram que a NAC pode reduzir a incidência de neuropatia induzida por oxaliplatina em pacientes com câncer de cólon (LIN, P. C., *et al.*, 2006); outros demonstram que a NAC pode ajudar na inibição da invasão de células cancerígenas (ALUIGI M. G., *et al.*, 2000); há também evidências de que o aumento do nível de GSH, ocasionado pela suplementação de NAC, pode prevenir a NPIQ (CASCINU., *et al.*, 1995). Todos esses estudos corroboram com nossos resultados, visto que a NAC demonstrou ser eficaz na redução da hiperalgesia mecânica e térmica, ajudou a diminuir a lipoperoxidação e também não foi benéfica para o crescimento tumoral.

A vitamina E é uma substância que apresenta propriedades antioxidantes significativas e tem demonstrado potencial em reduzir o risco de câncer em indivíduos que fazem dieta rica em vitamina E (DAS GUPTA *et al.*, 2015). Além disso, alguns estudos clínicos de fase II demonstram que a vitamina E (300 mg/dia) pode ter efeito na redução da NPIQ em pacientes recebendo paclitaxel (ARGYRIOU *et al.*, 2006). Embora seja um estudo de fase II, com limitado número de pacientes, tal resultado é semelhante ao que encontramos nesse trabalho, pois diminuiu a nocicepção mecânica e térmica e também foi capaz de diminuir a lipoperoxidação no fígado dos animais. Entretanto, os mecanismos exatos envolvendo a neuroproteção por vitamina E, e os outros antioxidantes aqui testados, não são bem conhecidos, dados que os três compostos antioxidantes aqui testados atuam por diferentes mecanismos de ação para reduzir o estresse oxidativo celular.

O ácido lipoico possui propriedades antioxidantes, sendo capaz de eliminar vários radicais livres. Somado a isso, alguns autores demonstraram que o ácido lipoico pode apresentar atividade antitumoral em alguns tipos de câncer (UNIT, 2005); outros dizem que o antioxidante não foi eficaz na prevenção da neuropatia induzida por oxaliplatina em pacientes com câncer (GUO., *et al.*, 2014), porém afirmam que esse resultado pode ser devido a baixa

adesão dos pacientes. Outros estudos como o de Dinicola e colaboradores (2018), Dozio e colaboradores (2010) demonstraram que o ácido lipoico ajuda na atividade antitumoral e no tratamento da NPIQ. Sendo assim, os resultados que obtivemos nesse trabalho fortalecem a teoria de que o ácido lipoico pode ser um candidato ao tratamento da NPIQ, visto que nossos dados mostram que ajudou a reduzir os parâmetros nociceptivos.

## 7. CONCLUSÃO

Primeiramente, foi possível concluir que o paclitaxel é um quimioterápico capaz de induzir neuropatia periférica na dose de 5 mg/kg em camundongos *Swiss*. Além disso, o presente trabalho demonstrou que a NAC, ácido lipoico e vitamina E utilizados na dose de 50 mg/kg foram capazes de reduzir a nocicepção mecânica e térmica provocada pela neuropatia induzida pelo paclitaxel. Ainda, observamos que os antioxidantes combinados com paclitaxel resultou em um efeito antitumoral, embora o uso isolado do quimioterápico não foi eficaz sobre a linhagem de células utilizadas para induzir o tumor *in vivo*.

Com relação ao quadro de estresse oxidativo provocado pelo paclitaxel, os três antioxidantes utilizados foram capazes de reduzir da peroxidação lipídica no fígado. No coração e no rim, o paclitaxel não causou lipoperoxidação, e o efeito dos antioxidantes não foi possível de ser determinado. Não houve resultados significativos sobre a quantidade de grupamentos sulfidril totais e proteínas carboniladas em nenhum dos órgãos analisados. Ainda, o quimioterápico e os antioxidantes não foram tóxicos para os tecidos renal e hepático.

Concluindo, os resultados sustentam a hipótese de que os antioxidantes são fármacos em potencial para o tratamento da neuropatia periférica induzida por paclitaxel. Porém, estudos não-clínicos mais aprofundados e, principalmente, clínicos randomizados devem ser realizados.

## REFERÊNCIAS

- ALUIGI M. G., DE FLORA S., D'AGOSTINI F., ALBINI A. AND FASSINA G. (2000). Antiapoptotic and antigenotoxic effects of N-acetylcysteine in human cells of endothelial origin. **Anti- cancer Res.** 20: 3183–3187.
- ARETI, A., YERRA, V. G., NAIDU, V., & KUMAR, A. (2014). Oxidative stress and nerve damage: Role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. **Redox Biology**, 2, 289–295.
- ARGYRIOU, A. A., CHRONI, E., KOUTRAS, A., ICONOMOU, G., PAPANETROPOULOS, S., POLYCHRONOPOULOS, P., & KALOFONOS, H. P. (2006). Preventing Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy: A Phase II Trial of Vitamin E Supplementation. **Journal of Pain and Symptom Management**, 32(3), 237–244.
- ARGYRIOU, A. A., KOLTZENBURG, M., POLYCHRONOPOULOS, P., PAPANETROPOULOS, S., & KALOFONOS, H. P. (2008). Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 66(3), 218–228.
- ARUOMA, O. I., B. HALLIWELL, B. M. HOEY, AND J. BUTLER. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radical Biol. Med.** 6:593–597.
- A. HORST, J.A. DE SOUZA, M.C.Q. SANTOS, A.P.K. RIFFEL, C. KOLBERG, and W.A. PARTATA. (2017). Effects of N-acetylcysteine on spinal cord oxidative stress biomarkers in rats with neuropathic pain. **Braz J Med Biol Res.** 50(12): e6533.
- AZZI, A. (2007). Molecular mechanism of  $\alpha$ -tocopherol action. **Free Radical Biology and Medicine**, 43(1), 16–21.
- BARON, R., BINDER, A., & WASNER, G. (2010). Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, 9(8), 807–819.
- BARTON, D. L., WATSON, J. C., & LOPRINZI, C. L. (2009). Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Prevention and Treatment. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 90(3), 377–387.
- BILSKA, A., & WODEK, L. (2005). Lipoic acid-the drug of the future? **Pharmacological Reports**. 57, 570-577.
- BREAST CANCER ORGANIZATION. U.S. Breast Cancer Statistics. Disponível em: <[https://www.breastcancer.org/symptoms/understand\\_bc/statistics](https://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics)>. Acesso em: 27 abr. 2019.
- BREAST CANCER ORGANIZATION. What is breast cancer? Disponível: <[https://www.breastcancer.org/symptoms/understand\\_bc/what\\_is\\_bc](https://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/what_is_bc)>. Acesso em: 27 abr. 2019.
- CAI, T., FASSINA, G., MORINI, M., ALUIGI, M. G., MASIELLO, L., FONTANINI, G., ALBINI, A. (1999). N-acetylcysteine inhibits endothelial cell invasion and angiogenesis.

Laboratory Investigation; a **Journal of Technical Methods and Pathology**, 79(9), 1151–1159.

CARVALHO, L.F; SILVA, A.M.F; CARVALHO, A.A. (2017) The use of antioxidant agents for chemotherapy- induced peripheral neuropathy treatment in animal models. **Clinical And Experimental: Pharmacology and Physiology**. Austrália, v. 44, p.971-979.

CASCINU S, CORDELLA L, DEL FERRO E, *et al.* (1995). Neuroprotective effect of reduced glutathione on cisplatin-based chemotherapy in advanced gastric cancer: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Journal of Clinical Oncology**;13(1):26–32.

CAVALETTI, G., FRIGENI, B., LANZANI, F., MATTAVELLI, L., SUSANI, E., ALBERTI, P., *et al.* (2010). Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity assessment: A critical revision of the currently available tools. **European Journal of Cancer**, 46(3), 479–494..

CHAPLAN, S. R., BACH, F. W., POGREL, J. W., CHUNG, J. M., & YAKSH, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, 53(1), 55–63.

CONSTANTINO, C., PAPAS, A., & CONSTANTINO, A. I. (2008). Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs. **International Journal of Cancer**, 123(4), 739–752. <https://doi.org/10.1002/ijc.23689>

DAS GUPTA, S., SO, J. Y., WALL, B., WAHLER, J., SMOLAREK, A. K., SAE-TAN, S., SUH, N. (2015). Tocopherols inhibit oxidative and nitrosative stress in estrogen-induced early mammary hyperplasia in ACI rats. **Molecular Carcinogenesis**, 54(9), 916–925.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS (DATASUS). Dados de mortalidade. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em 20 mar. 2019.

DESAI, A., MITCHISON, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 13: 83-117.

DHOUIB, I.E., JALLOULI M., ANNABI, A., GHARBI, N., ELFAZAA, S., LASRAM, M.M. (2016). A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. **Life Sci.** 151: 359–363, doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.003

DINICOLA, S., FUSO, A., CUCINA, A., SANTIAGO-REYES, M., VERNA, R., UNFER, V., BIZZARRI, M. (2018). Natural products - alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine - in the treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 22(14), 4739–4754.

DIXON, W. J. (1980). Efficient Analysis of Experimental Observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 20(1), 441–462.

DOZIO, E., RUSCICA, M., PASSAFARO, L., DOGLIOTTI, G., STEFFANI, L., PAGANI, A., MAGNI, P. (2010). The natural antioxidant alpha-lipoic acid induces p27Kip1-dependent

cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, 641(1), 29–34.

DUGGETT, NA., GRIFFITHS, LA., MCKENNA, OE., DE SANTIS, V., YONGSANGUANCHAI, N., MOKORI, EB., FLATTERS, SJL. (2016). Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. **Neuroscience**. 333:13–26.

ELBINI HOUIB, I., JALLOULI, M., ANNABI, A., GHARBI, N., ELFAZAA, S., LASRAM, M.M. (2016). A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. **Life Sci**. Apr 15;151:359-363. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.003. Epub 2016 Mar 2.

ELLIS, A., BENNETT, D.L. (2013) Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. **Br J Anaesth**. 111(1):26-37.

FIDANBOYLU, M., GRITTITHS, L. A., & FLATTERS, S. J. L. (2011). Global Inhibition of Reactive Oxygen Species (ROS) Inhibits Paclitaxel-Induced Painful Peripheral Neuropathy, 6(9).

FIDLER, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, 3, 1–6.

FITZMAURICE. *ET AL*. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990-2016. **JAMA Oncology**, v. 98121, 2018. Disponível em: <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2018>

FRUEHRAUF, J. P. & MEYSKENS, F. L. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? **Clin. Cancer Res**. 13, 789–794.

G. MELLI, M. TAIANA, F. CAMOZZI, D. TRIOLO, P. PODINI, A. QUATTRINI, F. TARONI, G. LAURIA. (2008). Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy, **Exp. Neurol**. 214. 276–284

GALUPPO, L.F, DOS REIS LÍVERO, F.A, MARTINS, G.G, CARDOSO, C.C, BELTRAME, O.C, KLASSEN, L.M, CANUTO, A.V, ECHEVARRIA, A, TELLES, J.E, KLASSEN, G, ACCO, A. (2016). Sydnone 1: A Mesoionic Compound with Antitumoral and Haematological Effects In Vivo. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 2016 Jul;119(1):41-50. doi: 10.1111/bcpt.12545. Epub 2016 Jan 25.

GOTTSCHALK, A., SMITH, D.S. (2001). New Concepts in Acute Pain Therapy: Preemptive Analgesia. **Am Fam Physician**. May 15;63(10):1979-1985.

GREENLEE, H., HERSHMAN, D.L., SHI, Z., KWAN, M.L., *et al*. (2016) BMI, Lifestyle Factors and Taxane-Induced Neuropathy in Breast Cancer Patients: The Pathways Study. **J Natl Cancer Inst**; 109.

GUO, Y., JONES, D., LYNN PALMER, J., FORMAN, A., DAKHIL, S. R., VELASCO, M. R., ... FISCH, M. (2014). Oral Alpha-Lipoic Acid to Prevent Chemotherapy-Induced

Peripheral Neuropathy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial HHS. Public Access. **Support Care Cancer**, 22(5), 1223–1231.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, G., SERENO, M., MIRALLES, A., CASADO-SÁENZ, E., & GUTIÉRREZ-RIVAS, E. (2010). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Clinical features, diagnosis, prevention and treatment strategies. *Clinical and Translational Oncology*, 12(2), 81–91.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, n.1, p.125–126.

HERSHMAN, D. L., LACCHETTI, C., DWORKIN, R.H., *et al.* (2014). Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. **J Clin Oncol** 32(18):1941-67.

HERSHMAN, D. L., UNGER, J. M., CREW, K. D., MINASIAN, L. M., AWAD, D., MOINPOUR, C. M., ... ALBAIN, K. S. (2013). Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Acetyl-L-Carnitine for the Prevention of Taxane-Induced Neuropathy in Women Undergoing Adjuvant Breast Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 31(20), 2627–2633.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edn. National Academies Press, Washington, DC, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). O que é o câncer. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 15 mar. 2019.

JASMIN, L., KOHAN, L., FRANSSEN, M., JANNI, G., & GOFF, J. R. (1998). The cold plate as a test of nociceptive behaviours: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. **Pain**, 75, 367–382.

JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY. Chemical structure for N-acetylcysteine. Disponível em: <<https://jasn.asnjournals.org/content/15/2/251/tab-figures-data>>. Acesso em: 25 mai. 2019.

KOTTSCHADE, L. A., SLOAN, J. A., MAZURCZAK, M. A., JOHNSON, D. B., MURPHY, B. P., ROWLAND, K. M., ... LOPRINZI, C. L. (2012). The use of vitamin E for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: results of a randomized phase III clinical trial. **Support Care Cancer**, 1769–1777.

LABORATÓRIO DE NEUROANATOMIA FUNCIONAL DA DOR (LAND). Dor e nocicepção. Disponível em: <<http://land.icb.usp.br/pb/dor-e-nocicepcao/>>. Acesso em: 26 mai. 2019.

LEE, J. J., & SWAIN, S. M. (2006). Peripheral Neuropathy Induced by Microtubule-Stabilizing Agents. **Journal of Clinical Oncology**, 24(10), 1633–1642.

LEONETTI, C., BIROCCIO, A., GABELLINI, C., SCARSELLA, M., MARESCA, V., FLORI, E., ... PICARDO, M. (2003). Alfa-tocopherol protects against cisplatin-induced

toxicity without interfering with antitumor efficacy. **International Journal of Cancer**, 104(2), 243–250.

LIN, P. C., LEE, M. Y., WANG, W. S., YEN, C. C., CHAO, T. C., HSIAO, L. T., ... CHIOU, T. J. (2006). N-acetylcysteine has neuroprotective effects against oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colon cancer patients: Preliminary data. **Supportive Care in Cancer**, 14(5), 484–487.

MAYO CLINIC. Breast cancer. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/breast-cancer/symptoms-causes/syc-20352470>>. Acesso em: 27 abr. 2019.

MELLI, G., TAIANA, M., CAMOZZI, F., TRIOLO, D., PODINI, P., QUATTRINI, A., LAURIA, G. (2008). Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. **Experimental Neurology**, 214(2), 276–284.

NELSON, D. L.; COX, MICHAEL, M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

MIZUNO, M., MINATO, K., ITO, H., KAWADE, M., TERAJ, H., TSUCHIDA, H. (1999) Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid cultured *Agaricus blazei* mill. **Biochem Mol Biol Int**. 1999;47:707–14.

NITIPIR, C. et al. (2018). Peripheral Neurotoxicity Induced by Taxanes, Cisplatin Oxaliplatin, Fluoropyrimidines and Vinorelbine. **Revista De Chimie (REV CHIM-BUCHAREST)**, 69, 3427–3432.

PALUMBO, M. O, *et al.* (2013). Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in Pharmacology**, May, p. 1–9.

QUASTHOFF, S. and HARTUNG, H. P. (2002). Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Journal of Neurology**, 249, 9-17.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. Farmacologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RIVERA, E., & CIANFROCCA, M. (2015). Overview of neuropathy associated with taxanes for the treatment of metastatic breast cancer, 659-670.

S.J.L. FLATTERS, G.J. BENNETT. (2006). Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction, **Pain** 122. 245–257. [27]

SAMUNI, Y., GOLDSTEIN, S., DEAN, O.M., BERK, M. (2013) The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochim Biophys Acta**. 1830: 4117–4129, doi: 10.1016/j.bbagen. 2013.04.016

SCHESTATSKY, P. & NASCIMENTO, O. J.M. (2009). What do general neurologists need to know about neuropathic pain ?, 67(March), 741–749

SCHLOSS, J. M. *et al.* Nutraceuticals and chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN): A systematic review. **Clinical Nutrition: An International Journal Devoted to Clinical Nutrition and Metabolism**. Austrália, v. 32, p.888-893, abr. 2013.

SHARP, D.J., ROGERS, G. C., and SCHOLEY, J. M. (2000). Microtubule motors in mitosis. **Nature**. 407, 41-47.

SIMÃO, D. A. S., *et al.* (2015). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: review for clinical practice. **Rev. dor** [online]. vol.16, n.3, pp.215-220. ISSN 1806-0013.

SISIGNANO, M., BARON, R., SCHOLICH, K., GEISLINGER, G. (2014). Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nat Rev Neurol**.10(12):694-707.

SMITH, E.M., PANG, H., CIRRINCIONE, C., *et al.* (2013). Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: A randomized clinical trial. **JAMA**. 309:1359-1367.

UNIT, M. N. (2005). WENZEL 2005.  $\alpha$ -lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer. **Apoptosis**. 2005 Mar;10(2):359-68.

WOLF, S., BARTON, D., KOTTSCHADE, L., GROTHEY, A., & LOPRINZI, C. (2008). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Prevention and treatment strategies. **European Journal of Cancer**, 44(11), 1507–1515.