



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE

FARMÁCIA

HENRIQUE RODRIGUES DE OLIVEIRA

**Papel dos receptores nucleares PPAR em modelo de neuropatia periférica
induzida por paclitaxel *in vitro***

CEILÂNDIA

2015

HENRIQUE RODRIGUES DE OLIVEIRA

Papel dos receptores PPAR em modelo de neuropatia periférica induzida por
paclitaxel *in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido
à Faculdade de Ceilândia da Universidade
de Brasília, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do Grau de
Bacharel em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. PAULO GUSTAVO BARBONI DANTAS NASCIMENTO

CEILÂNDIA

2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

Papel dos receptores PPAR em modelo de neuropatia periférica induzida por
paclitaxel *in vitro*

HENRIQUE RODRIGUES DE OLIVEIRA

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento
(Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília)

COORIENTADORA: Prof.^a Dra. Djane Braz Duarte
(Faculdade de Saúde – Universidade de Brasília)

Prof.^a Dra. Carine Royer
(Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília)

Prof.^a Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Sousa
(Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu o dom da vida, que com sua sabedoria me permitiu seguir em frente e que foi conforto nos momentos mais difíceis. Por permitir viver meus sonhos.

Aos meus pais (Zildevan e Angelice) e à minha irmã (Lílian), pelo amor e carinho. Pelo apoio e incentivo durante toda a trajetória percorrida. Pela presença ao meu lado para permitir que eu chegasse à essa etapa da minha vida. Obrigado!

Aos coordenadores do projeto Dor Online da UnB (Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas, Prof.^a Dra. Mani Indiana Funez e Prof.^a Dra. Djane Braz Duarte) que me apresentaram, de forma descontraída e agradável, a ciência. Muito obrigado por terem me apresentado o Projeto, que muito me direcionou para a escolha do tema deste trabalho.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas e Prof.^a Dra. Djane Braz Duarte, pela orientação e pela confiança depositada em mim. Pelas críticas construtivas e conselhos que tanto ajudaram na construção deste trabalho. Pela paciência e disponibilidade que sempre existiu. Meus sinceros agradecimentos por me mostrarem dia-a-dia o que é ciência e o que é amá-la!

À Prof.^a Dra. Michella Soares Coelho, que tanto me ajudou com os ensaios de RT-PCRq. Esse trabalho não seria o mesmo sem sua participação. Obrigado por ser tão prestativa e gentil.

Às Prof.^a Dra. Carine Royer e Prof.^a Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Sousa, que tão prontamente aceitaram compor a minha banca.

À Letícia, minha amada “prima-irmã”, que literalmente me ajudou com as palavras!

À minha tia Neide, tio Joaquim e ao meu primo Daniel, que sempre deram solução para que esse trabalho fosse concluído.

À Stela Carvalho, Maiza Gomes, Anna Paula Barros e Aline Vieira, por sempre me apoiarem e ajudarem. Pela sincera felicidade nos meus momentos felizes. Pelas angústias e medos divididos. Obrigado por fazerem parte dessa história.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa, Sonia Nuñez, João Carlos Sousa e Cristiane Vieira, que dividiram comigo a experiência de laboratório e que tanto aprendemos juntos. Obrigado!

Aos colegas do FarMol, que permitiram que os meus dias de experimento fossem agradáveis e torcerem para o meu sucesso.

Aos meus professores, que foram extremamente importantes durante minha vida acadêmica. Saibam que esse trabalho tem a contribuição de cada um de vocês.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

- Charles Chaplin

Resumo

O câncer é uma doença que possui alta incidência na sociedade moderna. Há estimativas que no biênio 2014/2015 ocorrerão aproximadamente 576 mil casos novos de câncer no Brasil, e que conseqüentemente são potenciais pacientes que farão tratamento antineoplásico. Dentre as mais diversas alternativas deste tratamento está o paclitaxel, que é utilizado como terapia de primeira linha e de segunda linha de vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama, ovário e pulmão. É sabido que assim como outros quimioterápicos, o paclitaxel induz neuropatia periférica (NP). Essa por sua vez é em sua maioria sensorial e dose-dependente. Embora esse efeito adverso seja bastante estudado, os mecanismos pelos quais os quimioterápicos causam a NP ainda não foram totalmente esclarecidos. Então, diante desses fatos, uma estratégia para prevenir ou tratar a neuropatia seria a neuroproteção. É possível que os Receptores Ativados por Proliferadores Peroxissomais (PPAR), possam atuar como neuroprotetores, já que está descrito seu papel neuroprotetor em doenças neurodegenerativas e na inflamação. Assim, foram feitas culturas primárias de células de Gânglios da Raiz Dorsal (GRD), para avaliar se o tratamento com paclitaxel altera a expressão de PPAR e/ou de mediadores inflamatórios. Os resultados demonstram que o tratamento com paclitaxel não alterou a expressão de PPAR α , PPAR γ ou da citocina pró-inflamatória TNF- α . Estes resultados contribuem para o entendimento da neurotoxicidade induzida pelo paclitaxel e para o embasamento de futuros estudos para avaliar se a ativação de PPAR induz neuroproteção em nosso modelo de neuropatia periférica.

Palavras Chave: Paclitaxel, PPAR, Neuroproteção e TNF- α

Abstract

Cancer is a highly prevalent disease in modern society. It is estimated that in 2014/2015 approximately 576,000 new cases of cancer will occur in Brazil, and these are potential patients who will use anticancer treatment. Paclitaxel is one of the various alternatives to treat cancer and it is used as first- and second-line therapy of several cancers, including breast, ovary and lung cancer. It is known that like other chemotherapeutic agents, paclitaxel induces peripheral neuropathy (BOKEMEYER et al.), which is dose-dependent and mostly sensory neuropathy. Although this adverse effect is well studied, the mechanisms by which chemotherapy causes NP have not been fully understood. Besides, there is no effective treatment. Thus, neuroprotection could be a strategy for preventing or treating chemotherapy-induced peripheral neuropathy. It is possible that Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) can act as a neuroprotective agent, since others authors demonstrated this effect in models of neurodegenerative diseases and inflammation. Thus, we established dorsal root ganglia (DRG) primary cultures to evaluate whether treatment with paclitaxel alters PPAR and/or inflammatory mediators expression. The results show that paclitaxel treatment did not alter the expression of PPAR α , PPAR γ or TNF- α . These results contribute to the understanding of the neurotoxicity induced by paclitaxel and would be used to support future studies to assess whether the PPAR activation induces neuroprotection in our peripheral neuropathy model.

Keywords: Paclitaxel, PPAR, Neuroprotection and TNF- α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sítios de ação e classes de quimioterápicos utilizados no manejo das neoplasias	17
Figura 2 - Estrutura química do paclitaxel	18
Figura 3 - Mecanismo de ação do paclitaxel	19
Figura 4 - Estrutura geral e domínios funcionais de um receptor nuclear	25
Figura 5 - Mecanismos de transativação e transrepressão mediados pelos receptores ativados por proliferadores peroxissomais	26
Figura 6 - Esquema representativo das três isoformas de PPAR	27
Figura 7: Coluna vertebral seccionada sagitalmente expondo em seu interior os gânglios da raiz dorsal	33
Figura 8 - Representação esquemática do desenho do estudo de cultura e tratamento das células extraídas dos gânglios da raiz dorsal com paclitaxel e DMSO	34
Figura 9 - Aspecto morfológico da cultura de células do GRD	42
Figura 10 - Aspecto morfológico da cultura de células do GRD após tratamento ...	43
Figura 11 - Análise da integridade das subunidades 28S e 18S das amostras de RNA total	44
Figura 12 - Avaliação de amplificação e especificidade da sequência de <i>primer</i> para gene GAPDH	46
Figura 13 - Avaliação de amplificação e especificidade da sequência de <i>primer</i> para gene TNF- α	47
Figura 14 - Avaliação de amplificação e especificidade da sequência de <i>primer</i> para gene PPAR γ	48

Figura 15 - Expressão gênica relativa do RNA mensageiro da citocina próinflamatória TNF- α e do PPAR γ em cultura de células do gânglio da raiz dorsal	49
Figura 16 - Efeito do tratamento com Paclitaxel na expressão de PPAR α e quantificação densitométrica de PPAR α	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mecanismos envolvidos na Neuropatia Periférica Induzida por Paclitaxel	22
Tabela 2 - Reagentes da reação em cadeia de polimerase e suas respectivas quantidades	37
Tabela 3 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real	38
Tabela 4 - Leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm das amostras de tRNA e apresentação do grau de pureza e quantificação final do tRNA, expressa em µg/µL	44
Tabela 5 - Concentração de proteínas após leitura da absorvância no comprimento de onda de 595 nm das amostras tratadas com Paclitaxel e DMSO (µg/mL)	50

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
Ct	Ciclo limiar
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DPEC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDU	5-fluoro-2-deoxyuridine
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
IL-1 β	Interleucina 1 beta
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NP	Neuropatia Periférica
NPIP	Neuropatia Periférica Induzida por Paclitaxel
NPIQ	Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterápicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PPAR	Receptores ativados por proliferadores peroxissomais

PPAR α	Receptor alfa ativado por proliferadores peroxissomais
PPAR β/δ	Receptor beta ativado por proliferadores peroxissomais
PPAR γ	Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais
RN	Receptor Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
tRNA	Ácido Ribonucleico total
RPM	Rotações Por Minuto
RXR	Receptor de Retinóide X
RT	Transcrição Reversa
RT-PCRq	Transcrição Reversa e Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real e Quantitativa
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
Tm	temperatura de dissociação / <i>Melting temperature</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
WB	<i>Western Blot</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1.	Câncer	16
1.2.	Paclitaxel	18
1.3.	Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterápicos	20
1.4.	Neuroproteção	23
1.5.	Receptores Nucleares e PPAR	24
2.	JUSTIFICATIVA	29
3.	OBJETIVOS	30
3.1.	Objetivo geral	30
3.1.1.	Objetivos específicos	30
4.	METODOLOGIA	31
4.1.	Materiais	31
4.2.	Animais	31
4.3.	Isolamento de neurônios sensoriais primários	32
4.4.	Cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal	33
4.4.1.	Análise da expressão gênica relativa por RT-PCRq	34
4.4.2.	Quantificação do RNA total e determinação da pureza e integridade do RNA da amostra	36
4.4.3.	Transcrição reversa e amplificação por PCR em tempo real quantitativo	36
4.5.	Deteção proteica (Western Blot)	39
4.6.	Análise estatística	41
5.	RESULTADOS	42
5.1.	Estabelecimento de cultura primária de células do Gânglio da Raiz Dorsal	42
5.2.	Efeito do tratamento com Paclitaxel sobre a expressão gênica de PPAR e TNF- α em células do gânglio da raiz dorsal	43
5.3.	Efeito do tratamento com Paclitaxel sobre a expressão de PPAR α em células do gânglio da raiz dorsal	50
6.	DISCUSSÃO	52
7.	CONCLUSÕES	55
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

9. ANEXO 1 - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA	69
---	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é uma doença multifatorial que acomete uma grande parcela da população mundial. Entende-se que câncer é na realidade um conjunto que compreende mais de 100 tipos de doenças e que essas possuem como característica em comum o crescimento desordenado de células anormais e que possuem potencial invasivo. Consoante com a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde houveram 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de óbitos em decorrência do câncer em 2012 (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, 2014).

A OMS preconiza que para o controle do câncer a melhor alternativa é a prevenção e orienta que, se medidas de prevenção para o seu controle não forem tomadas, ele passará a ocupar o primeiro lugar em mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento (INCA, 2014).

O INCA estimou que no biênio 2014/2015 ocorrerão aproximadamente 576 mil novos casos de câncer. Em escala decrescente, os cânceres mais prevalentes são o câncer de pele do tipo não melanoma, com 182 mil casos novos, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminino (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014). Para o tratamento dos mais diversos cânceres em seus diferentes estadiamentos, incluem-se radioterapia, hormonioterapia, remoção cirúrgica e também a quimioterapia. Para essa última, existem diversos medicamentos que atuam nos mais variados constituintes celulares que estão envolvidos na multiplicação celular e compreende drogas que estão representadas na figura abaixo (fig 1).

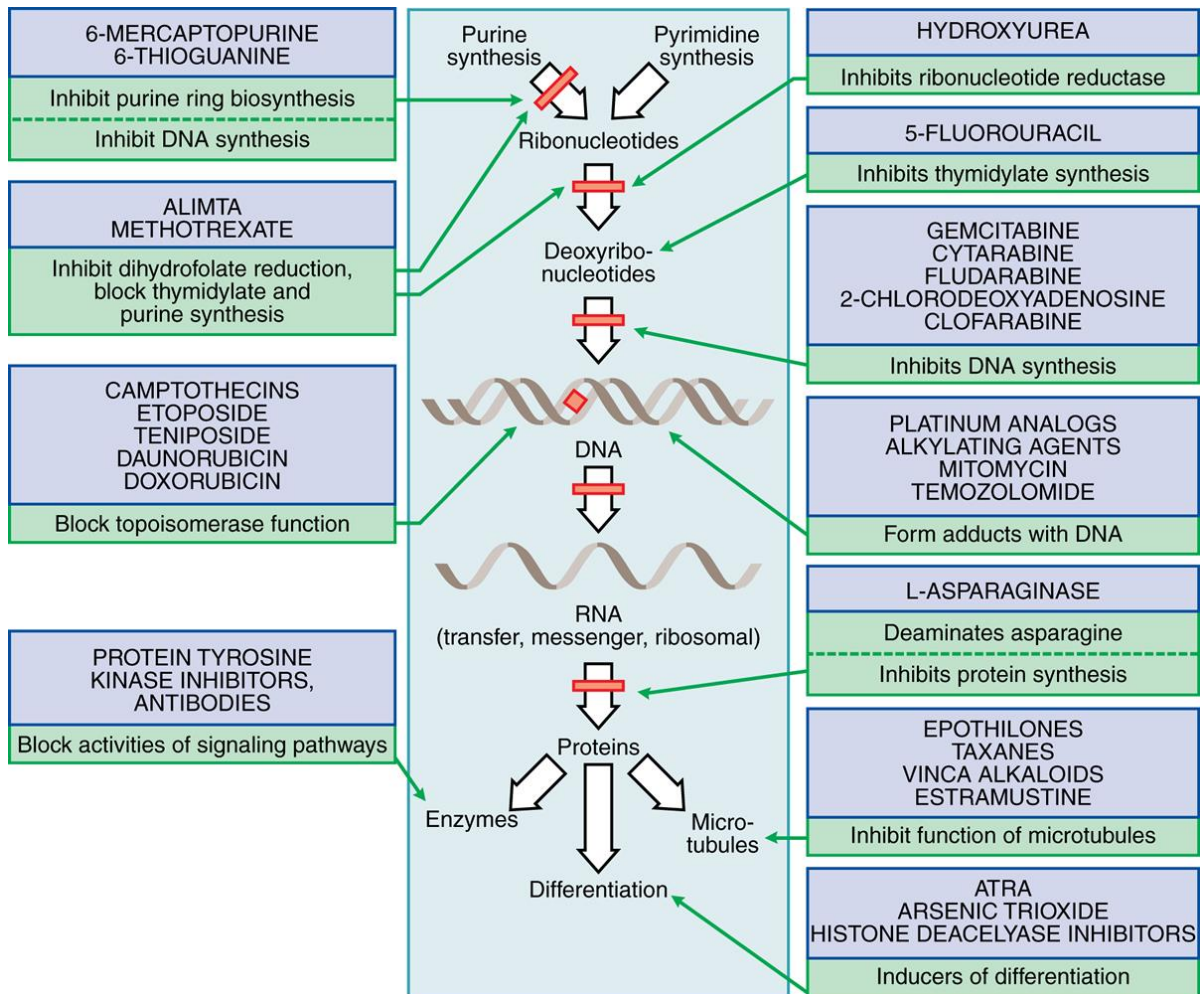


Figura 1 - Sítios de ação e classes de quimioterápicos utilizados no manejo das neoplasias.

Fonte: BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012, P. 1671

Dentre as mais diversas alternativas de quimioterapia o Paclitaxel, conhecido comercialmente como Taxol[®], é utilizado como terapia antineoplásica de primeira linha e também de segunda linha para vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama, ovário e pulmão. Segundo diretriz publicada pela National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomenda o uso do Paclitaxel como primeira linha de tratamento para o câncer de mama invasivo em todas as categorias das doenças que possuem a proteína *Human Epidermal Growth Fator Receptor 2* (HER2), em terapia combinada com doxorrubicina e ciclofosfamida. Como segunda linha, preconiza-se o uso do paclitaxel no manejo do câncer de mama HER2 negativos, também em terapia combinada com doxorrubicina e ciclofosfamida (NCCN, 2015).

1.2. Paclitaxel

Em 1960 o Instituto Nacional do Câncer dos EUA juntamente com o Departamento de Agricultura fizeram um projeto grandioso que consistiu em fazer um *screening* de produtos de plantas que possuíam um potencial efeito anticâncer, identificando o paclitaxel (CAMIDGE, 2001).

O Paclitaxel (Fórmula molecular: $C_{47}H_{51}NO_{14}$ e massa molecular: 853,906 g/mol) é classificado pela Organização das Nações Unidas como um dos medicamentos complementares para doenças prioritárias (WHO, 2013). No Brasil, atualmente o paclitaxel possui 4 registros de comércio na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – 2015)

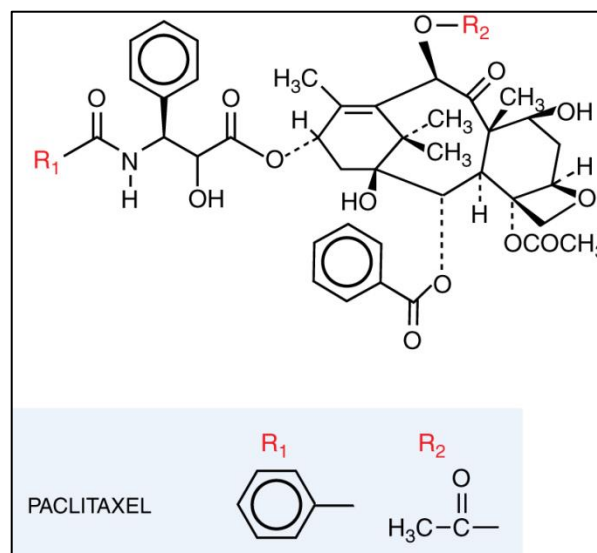


Figura 2 - Estrutura química do Paclitaxel.

Fonte: BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN (2012)

Quando descoberto, o paclitaxel era extraído da casca da *Taxus brevifolia*, conhecida popularmente por Teixo do Pacífico ou Teixo Ocidental. No entanto, observou-se que isso se tornaria inexecutável, uma vez que há uma quantidade limitada de árvores, além dessa exploração causar problemas ambientais (PANDEY, 1998). Desta forma, depois da descoberta da estrutura química do paclitaxel (WANI et al., 1971) sua fabricação atualmente é feita de forma semissintética. Então, das folhas do teixo é retirado um precursor da sua síntese, a 10-deacetylbaccatin III, e a ele é adicionado uma cadeia lateral (KINGSTON, 2000).

O paclitaxel é o protótipo da classe dos taxanos e possui uma estrutura química complexa e rara. Possui um anel taxano, comum a todos os medicamentos que pertencem à classe da qual o anel dá o nome, com um grupo oxetano nas posições C4 e C5 e um éster volumoso na posição C13 (KEARNS, 1997; RINGEL; HORWITZ, 1991; SCHIFF; FANT; HORWITZ, 1979; WANI et al., 1971), como visto na figura 2. Sua atividade antineoplásica é permitida em grande parte devido à cadeia lateral de um éster no anel taxano (CHABNER; LONGO, 1996).

O efeito antimitótico desta droga se dá pela atuação na dinâmica dos microtúbulos das células, que são imprescindíveis para que o processo de mitose ocorra (WILSON; JORDAN, 1995). À vista disso, o paclitaxel é extremamente prejudicial às células tumorais, que estão em processo de divisão celular descontrolada. Ele promove uma associação irreversível da tubulina no lúmen dos microtúbulos (SCHIFF et al., 1979) interagindo com a subunidade β do heterodímero da tubulina (NOGALES; WOLF; DOWNING, 1998), não permitindo dessa forma, que os microtúbulos se despolimerizem, e em consequência disso, há o progressivo aumento desses (figura 3). Esse mecanismo por sua vez aprisiona as células nas fases G2 e M da mitose e por fim, leva à apoptose (JORDAN; WILSON, 2004). Além disso, ele também aumenta a rigidez desses microtúbulos, que também pode contribuir para o estacionamento na mitose (DYE; FINK; WILLIAMS, 1993).

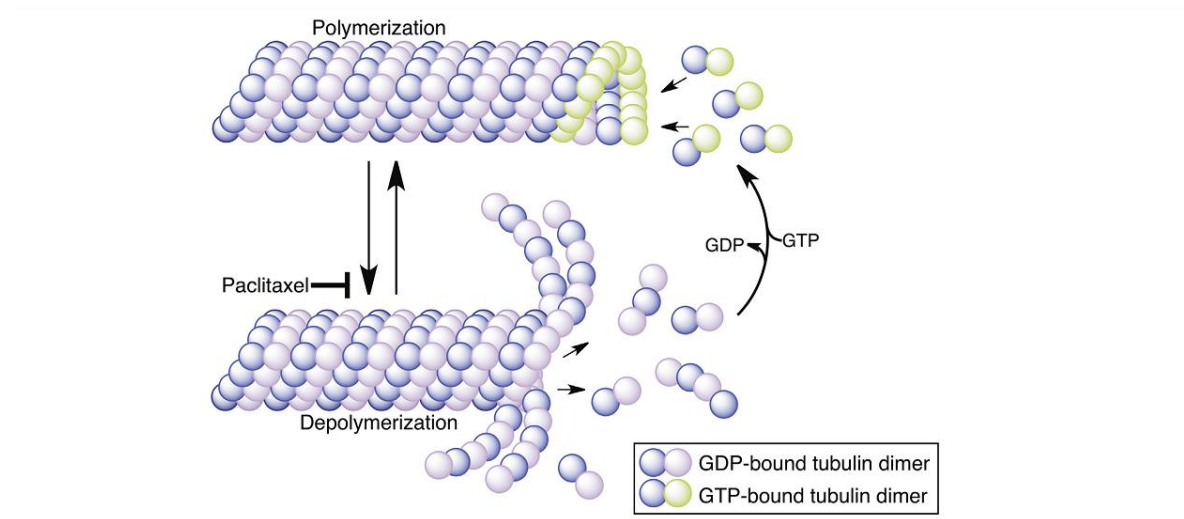


Figura 3 - Mecanismo de ação do paclitaxel.

Fonte: GORNSTEIN & SCHWARZ (2014).

Os microtúbulos são importantes não apenas nos processos de divisão celular como a mitose, mas também em funções cruciais à sobrevivência celular, tais como transporte intracelular, estruturação do citoesqueleto e motilidade axonal.

Em relação à farmacocinética do paclitaxel, ele apresenta ligação abundante à proteínas plasmáticas, com mais de 97% do seu total. Sua metabolização é feita no fígado através do sistema de enzimas P450 (CRESTEIL et al., 1994; HARRIS et al., 1994; RAHMAN et al., 1994; WALLE et al., 1995). É metabolizado em maior quantidade ao metabólito 6 α -hydroxypaclitaxel pela enzima CYP2C8, e em uma menor escala, ao 3-hydroxy, metabolizado pela enzima CYP3A4 (RAHMAN et al., 1994). A excreção é pela via biliar e 20% do total da dose infundida é eliminada nas primeiras 24 horas (MONSARRAT et al., 1990).

Apesar de ser uma droga eficiente e usada tanto em primeira linha, quanto como segunda linha de tratamento, o paclitaxel possui inúmeros efeitos adversos que comprometem os mais variados sistemas e órgãos. Segundo o Formulário Terapêutico Nacional de 2010 (FTN 2010) os mais frequentes são reações alérgicas, anafilaxia, mielossupressão, anemia, hemorragia, neutropenia febril, leucopenia, trombocitopenia, alopecia, náusea, vômitos, diarreia, estomatite, perfuração gastrintestinal, hipotensão, bradicardia transitória, infecções e neuropatia periférica (NP).

1.3. Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterápicos

Neuropatia Periférica é definida como um conjunto de lesões que acometem os neurônios do Sistema Nervoso Periférico (SNP). Quando a causa é o tratamento antineoplásico, esta é referida como Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterápicos (NPIQ).

Os alcalóides da vinca, os taxanos, os derivados da platina, bortezomibe e a talidomida são drogas que podem induzir NPIQ (WOLF et al., 2008). Tal neuropatia é em sua maioria sensorial e dose-dependente. Ocasionalmente relaciona-se com os nervos do sistema motor, autonômico ou cranial (GRISOLD; CAVALETTI; WINDEBANK, 2012). Na neuropatia periférica sensorial, os sintomas mais comuns são parestesia, alteração da propriocepção, alteração da sensibilidade térmica, além

da dor aguda ou crônica, e em alguns casos, pode levar à interrupção do tratamento quimioterápico (CAVALETTI; ALBERTI; MARMIROLI, 2011). Diversos fatores influenciam esse tipo de neuropatia, incluindo o acúmulo da dose, duração do tratamento, coadministração de outro quimioterápico neurotóxico (CAVALETTI et al., 1995; GUASTALLA et al., 1998) e condições pré-existentes como, por exemplo, injúrias nos nervos periféricos, abuso de álcool e diabetes (CHAUDHRY et al., 2003).

Esses sintomas tem autorresolução em alguns pacientes após a descontinuação do tratamento, no entanto, em outros, eles podem persistir por semanas ou mesmo por toda vida (PIGNATA et al., 2006), impactando diretamente a qualidade de vida deste paciente (LEE; SWAIN, 2006; MIELKE; SPARREBOOM; MROSS, 2006).

Não há consenso entre os autores quanto à incidência da neuropatia periférica (CAVALETTI; MARMIROLI, 2010). O que observa-se é que a incidência da NPIQ pode variar de 10% a 100% (SIMÕES et al., 2012). É válido ressaltar que a terapia combinada desses quimioterápicos pode aumentar também a incidência da NP (CONNELLY et al., 1996).

Em relação ao paclitaxel, quando a neuropatia periférica surge com seu uso, aqui será nomeada como Neuropatia Periférica Induzida por Paclitaxel (NPIP). Esse medicamento é muito efetivo em células de câncer proliferativas, porém em células que não apresentam divisão celular, também podem causar danos significativos (GORNSTEIN; SCHWARZ, 2014). Nos neurônios, por exemplo, o paclitaxel também induz polimerização da tubulina, que pode interferir no transporte axonal (MANFREDI; HORWITZ, 1984), sugerindo um possível mecanismo fisiopatológico da NPIP. Em estudo realizado por Cavaletti e colaboradores (2000) para avaliar a distribuição de paclitaxel, os autores demonstraram que após administração intravenosa desta droga há um acúmulo nos Gânglios da Raiz Dorsal (GRD) que não ocorre nos axônios, sugerindo que as alterações nas fibras nervosas podem ser secundárias ao envolvimento do GRD .

Atualmente há diversas hipóteses que tentam explicar o mecanismo pelo qual o paclitaxel causa neuropatia periférica e alguns desses mecanismos podem ser vistos na tabela abaixo.

Tabela 1 – Mecanismos envolvidos na Neuropatia Periférica Induzida por Paclitaxel

Alvos	Mecanismos	Referências
Perda de inervação intraepidermal	Degeneração axonal dos nervos sensoriais	(SIAU; BENNETT, 2006)
Alterações mitocondriais	Mitocôndrias vacuolizadas e edemaciadas nos axônios	(FLATTERS; BENNETT, 2006)
Cálcio	Expressão aumentada da subunidade $\alpha 2\delta$ -1 do receptor de cálcio no corno dorsal e no GRD Alteração da homeostasia do cálcio celular	(SIAU; XIAO; BENNETT, 2006; XIAO et al., 2007)
Canais de sódio	O aumento na corrente de sódio no GRD que predispõe à parestesia e fasciculações	(GHELARDINI et al., 2010; NIETO et al., 2008)
Receptor de Potencial Transitório Vanilóide (TRPV)	Suprarregulação dos canais TRPV1, TRPA1, TRPM8, TRPV4 nos neurônios do GRD, causando a hiper-responsividade dos nociceptores	(ALESSANDRI-HABER et al., 2008)
Inflamação	Ativação das células imunes residentes na pele Indução da produção de TNF- α e IL-1 β nos GRD lombares	(SIAU et al., 2006) (LEDEBOER et al., 2007)
Estresse oxidativo	Envolvimento de Radicais Livres de Oxigênio na alodinia mecânica induzida pelo Paclitaxel	(KIM et al., 2010)
Caspases e calpaínas	Ativação de proteases ativadas por cálcio como calpaínas e caspases no GRD	(BOEHMERLE et al., 2007)
Receptores NMDA	Antagonistas do receptor NMDA antagonizam agentes antineoplásicos que induzem a dor neuropática	(CAROZZI et al., 2010); (PASCUAL et al., 2010)
Neuropeptídios	Aumento de neuropeptídeo Y	(JAMIESON et al., 2007)

Como visto, há diversas alterações que ocorrem nas células durante a NPIQ. O paclitaxel promove mudanças desde alterações mitocondriais à mudança no perfil de liberação de neuropeptídios, na inflamação e estresse oxidativo. Assim, a NPIQ é um sintoma complexo, em que há diversos mecanismos envolvidos na sua gênese em diferentes constituintes celulares, podendo mesmo, a causa da neuropatia ser o conjunto de várias dessas alterações.

O desconhecimento do exato mecanismo fisiopatológico para o estabelecimento da neuropatia periférica dificulta o tratamento dos pacientes na clínica. Em trabalho recente publicado pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica os autores concluíram que não há recomendação para a prevenção da NPIQ além de diminuir a dose ou o tempo de tratamento do agente causador da neuropatia (HERSHMAN et al., 2014). A duloxetina é o medicamento recomendado para o tratamento da NPIQ já instalada (HERSHMAN et al., 2014). Estes dados mostram que são necessários estudos sobre os mecanismos de instalação e manutenção de NPIQ, bem como sobre ferramentas para avaliar os pacientes em uso de drogas que potencialmente possam causar neuropatia e ainda sobre novas drogas para prevenir ou tratar este importante efeito adverso.

1.4. Neuroproteção

Uma das principais estratégias para prevenir ou tratar a NPIQ é a neuroproteção. O grande desafio no desenvolvimento de drogas que possam ser neuroprotetoras advém ainda do conhecimento limitado acerca da NPIQ. Isso significa que o entendimento da fisiopatologia desse sintoma e a então identificação de alvos neuroprotetores, é uma das trajetórias possíveis para o desenvolvimento dessas drogas.

Há vários compostos que hoje são apresentados como neuroprotetores, dentre eles está a glutathiona, que apresentou-se um agente protetor na terapia com quimioterápicos derivados da platina, uma vez que pode alterar sua acumulação nos GRD (LEONE et al., 1992). Além desse, há vários outros compostos investigados na NPIQ, incluindo antidepressivos, anticonvulsivantes, minerais, vitaminas, etc.

Dentre as diversas propostas apresentadas como neuroprotetoras, estão os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR). Há vários estudos que mostram que a inflamação ocorre em desordens neurodegenerativas tanto no cérebro, como na medula espinhal (GLASS et al., 2010). Dessa forma, uma vez que os PPAR são capazes de suprimir o estresse oxidativo e também o processo inflamatório (MORAES; PIQUERAS; BISHOP-BAILEY, 2006), é possível que a ativação destes no SNP poderia prevenir e/ou tratar a NPIP.

Também já foram atribuídas propriedades neuroprotetoras à ativação do PPAR α em relação à resposta inflamatória induzida por radiação *in vitro* e *in vivo* (RAMANAN et al., 2010). Assim como o PPAR γ , que quando ativado pela pioglitazona, induziu melhora da severidade dos sintomas induzidos pela radiação (RAMANAN et al., 2010).

Porém, é importante destacar que a eficiência do agente quimioterápico está vinculada ao desenvolvimento de neurotoxicidade (PARK, S. B. et al., 2008). Assim, o desafio é encontrar uma droga neuroprotetora que não interfira com o potencial quimioterápico de drogas antineoplásicas.

1.5. Receptores Nucleares e PPAR

Os receptores nucleares (RN) são um dos vários tipos de receptores celulares e constituem atualmente uma parcela de proteínas envolvidas em diversas funções do organismo. São imprescindíveis para o desenvolvimento, controlam a homeostase, induzem ou inibem a proliferação, a diferenciação e morte celular (MORAS; GRONEMEYER, 1998).

São divididos em três classes filogeneticamente: Tipo I, II e órfãos; sendo os do tipo I, os receptores clássicos ou esteroides, os do tipo II são os que dimerizam com o Receptor de Retinóide X (RXR) e os receptores órfãos, que são os que ainda não encontrou-se o seu ligante (MCKENNA; LANZ; O'MALLEY, 1999). Os PPAR são classificados como receptores nucleares do tipo II, portanto formam um heterodímero com receptor retinóide X e se ligam a um local específico no DNA para ativar a transcrição gênica.

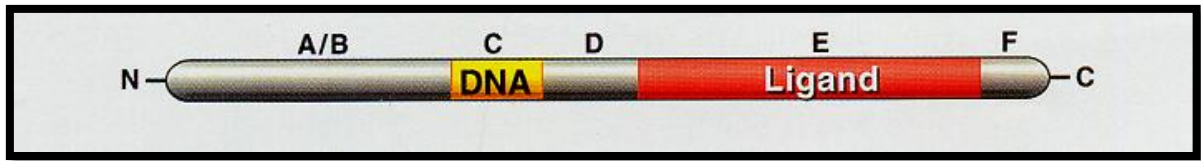


Figura 4 - Estrutura geral e domínios funcionais de um receptor nuclear

Fonte: adaptado de MANGELSDORF et al. (1995).

Os receptores nucleares possuem sete domínios. O domínio de ligação ao DNA, representado pelo domínio C, é a região mais bem preservada do receptor. O domínio de ligação ao ligante, representado pela letra E, é pouco preservado quando comparado ao domínio C. Além desses, os RN possuem mais 4 domínios (A, B, D, F), baseados em regiões de sequência e funções preservadas. A região A-B, conhecida como AF-1 possui uma função transativadora promotora e célula-específica. A região D é a região de dobradiça e a F (não está presente em todos os RN) cuja função é pouco conhecida (BOURGUET; GERMAIN; GRONEMEYER, 2000).

Após a ligação ao RXR, os PPAR mudam sua conformação tridimensional, estabilizando-a, com o propósito de recrutar uma proteína coativadora ou mais, caracterizando o mecanismo chamado de transativação (WILLSON; LAMBERT; KLIEWER, 2001). O resultado dessa ligação é uma expressão gênica aumentada. Além desse mecanismo de ação, os receptores nucleares ativados por proliferadores peroxissomais possuem um segundo mecanismo, em que há supressão de outros fatores de transcrição que usam os mesmo co-ativadores, quando esses últimos estão em pouca quantidade, mecanismo conhecido como transrepressão (DELERIVE; DE BOSSCHER; et al., 1999; DELERIVE; MARTIN-NIZARD; et al., 1999) como visto na figura 5.

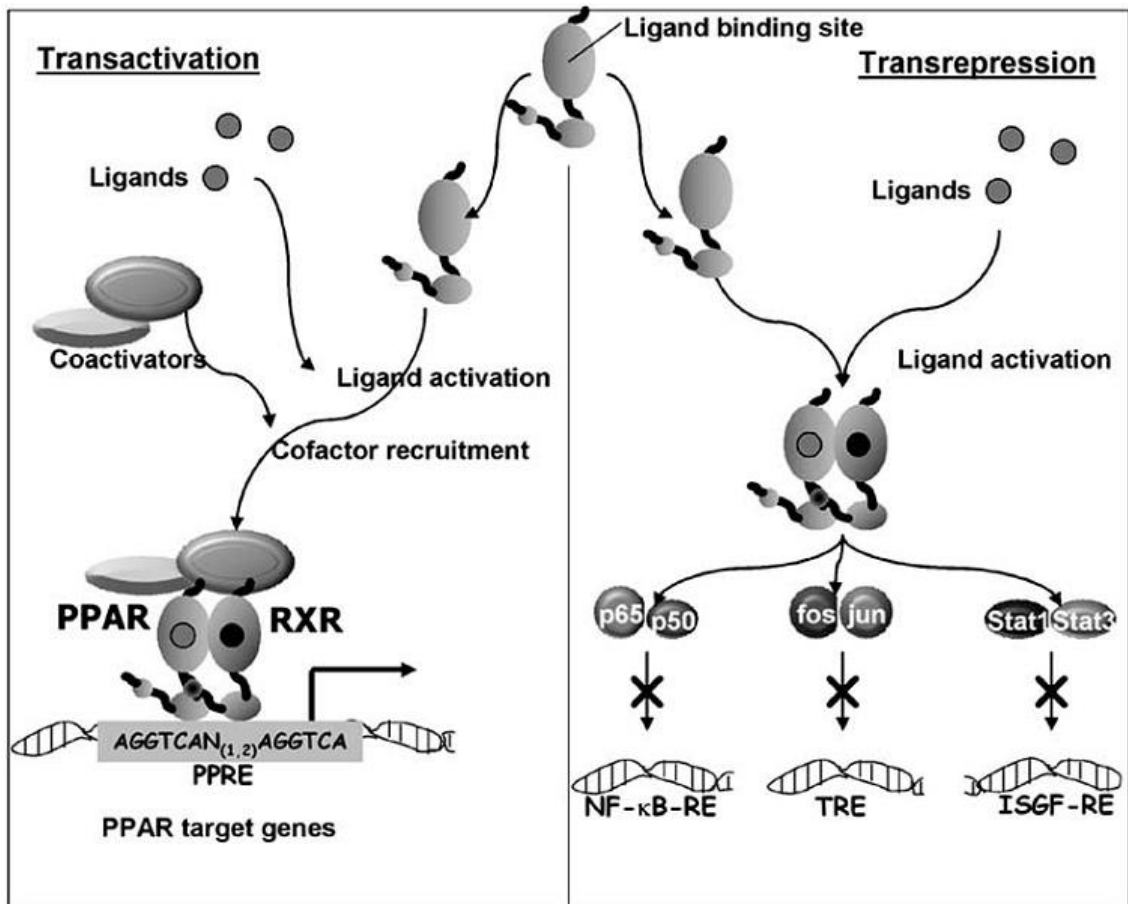


Figura 5 - Mecanismos de transativação e transrepressão mediados pelos receptores ativados por proliferadores peroxissomais.

Fonte: COLL et al. (2009).

São descritos 3 isoformas desses receptores, o PPAR α , PPAR β/δ e o PPAR γ (BERGER, J. P.; AKIYAMA; MEINKE, 2005; MICHALIK; WAHLI, 2006) e esses são encontrados em diversos tecidos, incluindo o sistema nervoso (HENEKA; LANDRETH, 2007). Ademais, já há propostas que sugerem que a ativação dos PPAR nos neurônios pode influenciar diretamente na viabilidade celular e sua diferenciação (CIMINI et al., 2005; HENEKA; KLOCKGETHER; FEINSTEIN, 2000; INESTROSA et al., 2005; PARK, K. S. et al., 2004).

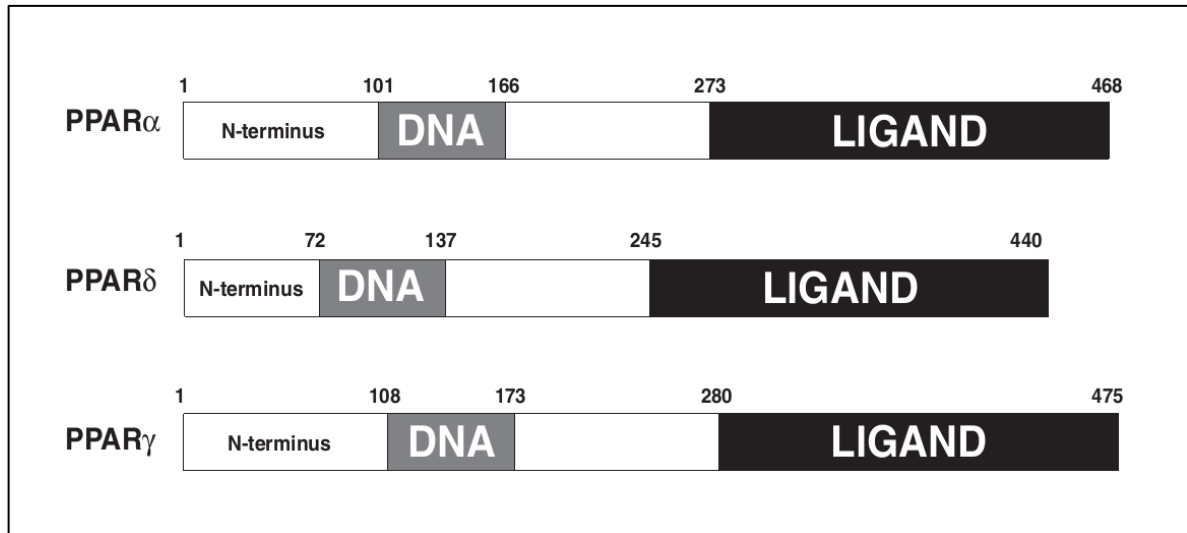


Figura 6 - Esquema representativo das três isoformas de PPAR.

Fonte: YOUSSEF & BADR (2011).

Os PPAR são ativados por ligantes endógenos oriundos do metabolismo de ácidos graxos e outros compostos encontrados na dieta, o que é congruente com o fato dos PPAR regularem a expressão de genes que abrangem o metabolismo de glicose e também de lipídeos (WAHLI; BRAISSANT; DESVERGNE, 1995). Sabe-se também que estão envolvidos em diferentes processos fisiológicos e são interesse de vários pesquisadores por serem elementares, por exemplo, na supressão do estresse oxidativo e inflamação (MORAES et al., 2006).

O PPAR α foi o primeiro subtipo a ser identificado em camundongos (ISSEMANN; GREEN, 1990) e posteriormente, em diversas espécies de animais como sapos, ratos, coelhos, e humanos (DREYER et al., 1992; GOTTLICHER et al., 1992; GUAN et al., 1997; SHER et al., 1993). Este subtipo dos PPARs é encontrado em órgãos que requerem oxidação de ácidos graxos como fonte energética (ESCHER et al., 2001). Dessa forma constatou-se que ele é expresso numerosamente em órgãos que são metabolicamente ativos, como fígado, rins, coração, músculo esquelético, e tecido adiposo marrom (AUBOEUF et al., 1997; BRAISSANT et al., 1996). Além disso, o PPAR α possui papel no controle da inflamação, já que observou-se que camundongos deficientes desse receptor possuíam uma resposta inflamatória prolongada quando expostos ao leucotrieno B4 (LTB4), que é um ligante específico do PPAR α (DEVCHAND et al., 1996). Também

já foi demonstrado que há expressão de PPAR α no SNC, e que estes estão envolvidos na via de sinalização nociceptiva (TAYLOR et al., 2002).

O PPAR γ é essencial para a adipogênese e o armazenamento de gordura (TONTONOZ; HU; GRAVES; et al., 1994; TONTONOZ; HU; SPIEGELMAN, 1994) além da diferenciação de adipócitos (BERGER, J.; MOLLER, 2002). Ambos os isotipos de PPAR γ (PPAR γ 1 e PPAR γ 2) são encontrados tanto em humanos quanto em ratos (ELBRECHT et al., 1996; ZHU et al., 1995), diferindo entre si em apenas 30 aminoácidos (BERGER, J.; MOLLER, 2002). O subtipo 1 de PPAR γ é o que está mais presente no tecido adiposo, assim como no intestino (FAJAS et al., 1997).

Assim como o PPAR α , o subtipo γ também está envolvido na inflamação (DELERIVE; FRUCHART; STAELS, 2001; DEVCHAND et al., 1996; KOSTADINOVA; WAHLI; MICHALIK, 2005). Foi descrito que os ligantes dessa isoforma modulam a inflamação, pois são capazes de inibirem a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias em monócitos, como o TNF e a Interleucina 1 (JIANG; TING; SEED, 1998).

A terceira isoforma dos receptores PPAR é o receptor do tipo δ , também conhecido como PPAR β ou ainda PPAR β/δ . A expressão dessa isoforma é bem documentada no SNC, particularmente em altos níveis no giro dentado, hipocampo, córtex telencefálico, cerebelo e núcleo talâmico (BRAISSANT et al., 1996; KREMARK-BOUILLAUD; SCHOHN; DAUCA, 2000; XING et al., 1995). Ainda, diversos estudos também apontam para envolvimento do PPAR δ na inflamação (LIM et al., 2009; LIU et al., 2011; NAGASAWA et al., 2006; SHAN; NICOL; et al., 2008; SHAN; PALKAR; et al., 2008). Esse mecanismo decorre pela transrepressão feita pelo receptor, alterando a sinalização dependente de NF- κ B, que causa redução de citocinas pró-inflamatórias (PETERS; SHAH; GONZALEZ, 2012).

Em suma, as três isoformas de PPAR parecem estar envolvidas em mecanismos de controle do processo inflamatório e de neuroproteção. Desta forma, nossa hipótese é de que a ativação destes receptores poderia ter um papel neuroprotetor na neuropatia periférica induzida por quimioterapia. No entanto, para testar esta hipótese primeiro é necessário que se conheça o perfil de expressão destes receptores no sistema nervoso periférico e se o tratamento com o paclitaxel alteraria esta expressão.

2. JUSTIFICATIVA

Com o envelhecimento da população a incidência de câncer tende a aumentar, e conseqüentemente, mais pessoas receberão tratamento antineoplásico. Ainda que o tratamento do câncer tenha evoluído, aumentando a sobrevivência dos pacientes, há algumas considerações que devem ser ponderadas. Essas incluem, por exemplo, o custo e tempo do tratamento, além dos efeitos adversos.

Uma das alternativas de tratamento são os quimioterápicos, que são eficazes e podem ser administrados de forma oral, diminuindo o desconforto do paciente. Apesar da comodidade, alguns medicamentos apresentam como efeito adverso, a NPIQ. Ademais, esse sintoma piora não só a qualidade de vida dos pacientes que recebem o tratamento, mas também a da família dessas pessoas. É necessário destacar que em alguns casos, a NPIQ pode até mesmo levar o paciente à interrupção do tratamento do câncer. Logo, são necessárias pesquisas para compreender a fisiopatologia deste importante efeito adverso, com o objetivo de tratar ou mesmo prevenir a instalação da NPIQ.

Os PPAR são alvos farmacológicos promissores, visto que há pesquisas que mostram os efeitos protetores no SNC, observados em várias patologias neurodegenerativas. Desta forma, avaliar o papel destes receptores na neuropatia periférica induzida por paclitaxel pode colaborar para elucidar um novo alvo terapêutico para a prevenção ou tratamento deste importante efeito adverso da terapia antineoplásica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o papel neuroprotetor dos receptores PPAR na neuropatia periférica induzida por paclitaxel.

3.1.1. Objetivos específicos

Investigar se o tratamento com paclitaxel em modelo *in vitro* de cultura de células de GRD altera a expressão de PPAR;

Investigar se o tratamento com paclitaxel em modelo *in vitro* de cultura de células de GRD altera a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α .

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

Os reagentes poli-D-lisina (PDL), laminina, colagenase, 5,fluoro2'-deoxiuridina (FDU), uridina, dimetil sulfóxido (DMSO), dietilpirocarbonato (DPEC), kit DNase-AMPD1, Ortovanadato de sódio, pirofosfato de sódio, coquetel inibidor de protease, fungizona, estreptomicina e paclitaxel foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canadá). O meio de cultura F12, o soro de cavalo inativado por calor e a L-glutamina foram adquiridos da Gibco®, Life technologies (Carlsbad, CA, EUA). O Isoflurano foi obtido dos Laboratórios Abbott (Chicago do Norte, IL, EUA), o TRIzol da empresa Ambion® RNA, Life Technologies (Austin, TX, EUA), a albumina sérica bovina (BSA) da empresa Biolabs (Beverly, MA, USA), a solução de Bradford foi adquirida da empresa BioRad (Hercules, CA, USA) e a normocina da InvivoGen (San Diego, CA, USA). O Kit Power SYBR Green-to-Ct ONE STEP usado nos ensaios de quantificação de RNA mensageiro foi adquirido da empresa Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA) e os géis de poliacrilamida para separação de proteínas, bem como o kit de detecção de *western blot* (Solução Intensificadora de Luminol e solução de peróxido) foram da GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, Inglaterra).

4.2. Animais

Os experimentos foram feitos com ratos machos e fêmeas (*Rattus norvegicus*) pertencentes à linhagem Wistar com peso compreendendo entre 200 – 300 g. Os animais utilizados são provenientes do Biotério da Universidade de Brasília e foram agrupados em gaiolas com 4 a 5 animais cada uma, obedecendo ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*. A temperatura e a umidade do biotério foram ambientes. A manipulação dos animais foi realizada no intervalo entre a fase clara do ciclo claro-escuro (entre 8 e 16 horas).

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas e diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Ética do Uso Animal da Universidade de Brasília (protocolo de autorização UnBdoc nº 55724/2013, Anexo 1).

4.3. Isolamento de neurônios sensoriais primários

Foram feitas culturas primárias de células dos Gânglios da Raiz Dorsal (GRD). Os animais foram eutanasiados com Isoflurano e posteriormente decapitados com guilhotina. Seguiu-se então os procedimentos apresentados por Burkey et al. (2004) . A coluna vertebral foi extraída, seccionada sagitalmente, expondo assim os GRDs, como mostrado na figura 7. Os GRDs foram removidos com o uso de pinças, as raízes centrais e periféricas foram retiradas com uso de lâmina de bisturi e os gânglios então incubados a 37°C por 1 hora em colagenase a 0,125%. Em seguida os gânglios foram processados mecanicamente por meio de sucessivas ressuspensões em meio de cultura através de pipeta pasteur de vidro. As células dissociadas foram plaqueadas em placas de 6 poços pré-tratadas com PDL e laminina, em volume de 2 ml de meio de cultura e aproximadamente 60.000 células/poço.

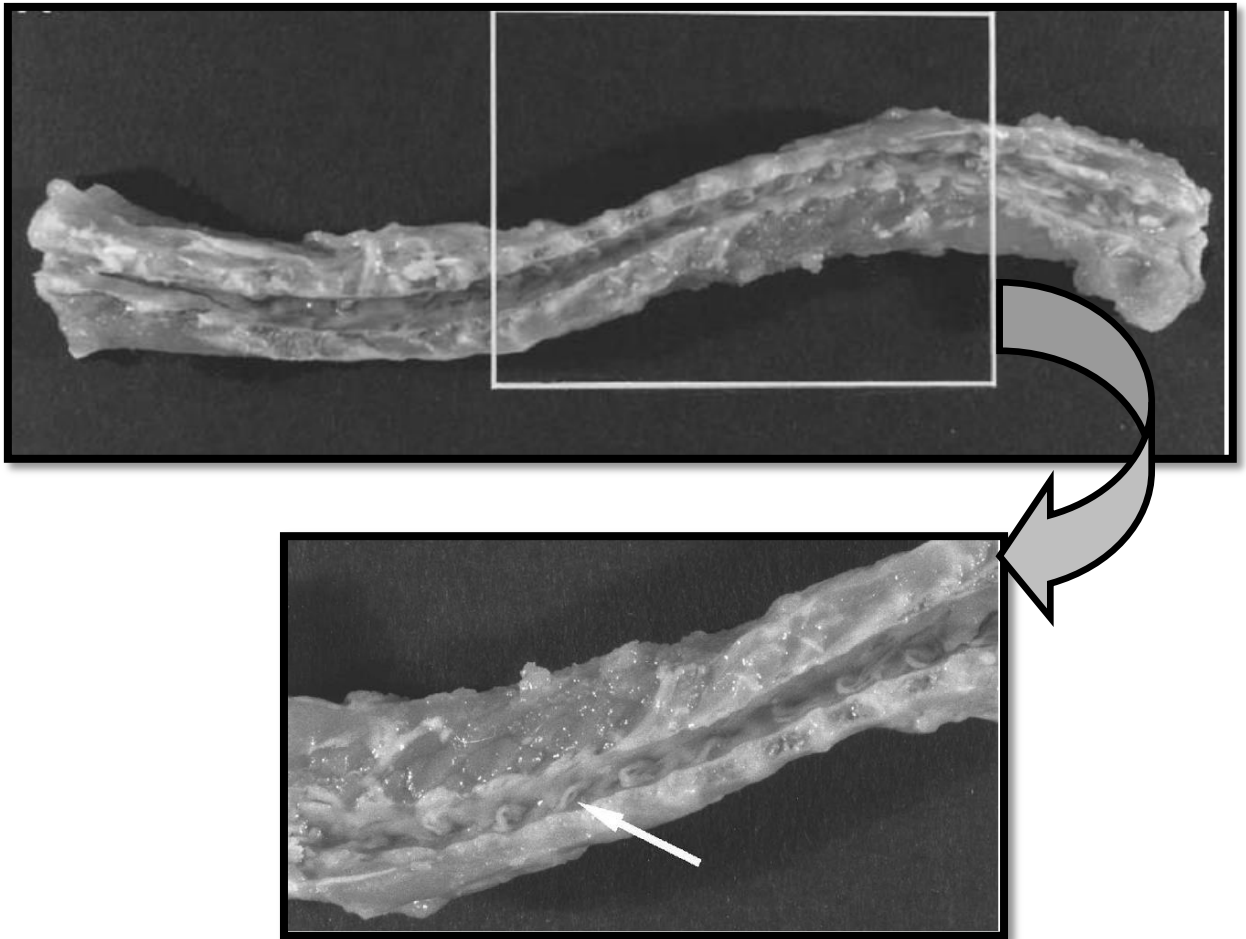


Figura 7: Coluna vertebral seccionada sagitalmente expondo em seu interior os gânglios da raiz dorsal (seta branca).

Fonte: BURKEY et al. (2004).

4.4. Cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal

A cultura de células foi feita em meio F12 adicionado de 10% de soro de cavalo inativado por calor, 2 mM L-glutamina, 50 µg/ml penicilina e estreptomicina, 50 µM de FDU e 150 µM de uridina e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado após as primeiras 24 horas da semeadura e nos dias subsequentes foi trocado em dias alternados. O tratamento foi realizado com 300 nM de Paclitaxel diluído em DMSO (0,03%), sendo portanto esse o veículo e, conseqüentemente, o controle negativo do experimento (PITTMAN et al., 2014). Após cinco dias de tratamento as células foram coletadas e congeladas a -20° C

para posterior extração de RNA mensageiro ou de proteína de acordo com os experimentos. O desenho do estudo pode ser observado na figura 8.

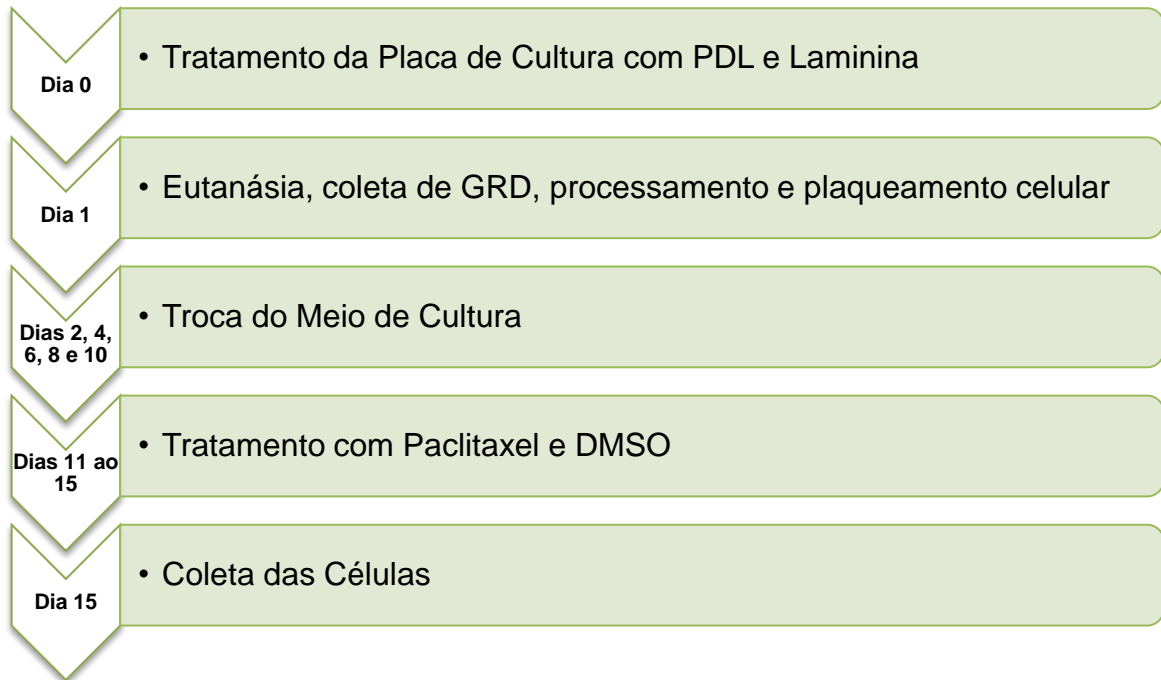


Figura 8 - Representação esquemática do desenho do estudo de cultura e tratamento das células extraídas dos gânglios da raiz dorsal com paclitaxel e DMSO.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.1. Análise da expressão gênica relativa por RT-PCRq

A expressão gênica foi avaliada por meio da extração de RNA total seguida da síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT) e amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real e quantitativa (RT-PCRq).

A transcrição reversa (RT) e amplificação por PCR quantitativa (PCRq) foram realizadas em um único passo utilizando-se o kit *Power SYBR Green-to-Ct ONE STEP* e seguindo protocolo fornecido pelo fabricante.

Para estes experimentos foram feitas culturas com GRD extraídos de 2 animais fêmeas. Após cinco dias de tratamento com paclitaxel cada poço das placas

foi lavado com Salina Tamponada com Fosfato (PBS) 1X após a remoção do meio de cultura para o procedimento de extração do RNA.

O RNA total foi extraído das amostras de células isoladas do GRD com o reagente TRIzol seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, as amostras foram homogeneizadas em 1 mL de TRIzol e incubadas a temperatura ambiente, durante 5 minutos, e em seguida centrifugadas a 14.000 rpm, durante 10 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 mL. A estes, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (por mL de TRIzol utilizado na etapa de homogeneização). Os tubos foram agitados em vórtex durante 15 segundos, incubados a temperatura ambiente durante 3 minutos e em seguida centrifugados a 14.000 rpm, durante 15 minutos, a 4° C. A fase superior (aquosa) foi transferida para outro tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol absoluto (por mL de TRIzol utilizado na etapa de homogeneização). Os tubos foram agitados em vórtex, incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 14000 rpm, durante 10 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 9000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para secagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de água bidestilada tratada com 0,1% (p/v) de dietilpirocarbonato.

Para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico e consequente influência sobre a avaliação da expressão gênica, as amostras de RNA foram tratadas com a enzima desoxirribonuclease (DNase) usando o *kit DNase-AMPD1* durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Desta forma, amostras contendo até 1 µg de RNA total foram tratadas com 1 unidade/µL de DNase I para um volume final de 10 µL. Em seguida, para inativação térmica da DNase I foi adicionado 1 µL de tampão de inativação (*Stop solution*) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - 50 mM, pH 8.0) seguido de incubação a 70°C, por 10 minutos. As amostras de RNA tratadas foram armazenadas em freezer a -80° C até sua utilização na RT-PCRq.

4.4.2. Quantificação do RNA total e determinação da pureza e integridade do RNA da amostra

A quantificação de RNA total nas amostras foi determinada por espectrometria, utilizando-se o aparelho NanoVue Plus (GE Health, Life Sciences, Buckinghamshire, UK), usando 1 µL da amostra. A concentração de RNA, fornecida automaticamente pelo equipamento em µg/µL, é determinada pelo seguinte cálculo: $(DO\ 260\ \text{nm} \times 40)/1000$, em que DO 260 representa o valor da densidade óptica da amostra determinada no comprimento 260.

O grau de pureza da amostra, também fornecido automaticamente pelo equipamento, é calculado pela razão entre as densidades ópticas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Consideraram-se satisfatórias as amostras em que essa razão estivesse entre 1,6 e 2,0, na medida em que estes valores representam baixa contaminação da amostra com proteínas.

Para determinar a integridade do RNA nas amostras, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%, com o objetivo de visualização do RNA ribossômico 18S e 28S. A observação de bandas correspondentes ao RNA ribossômico 18S e 28S foi considerada indício de não degradação de RNA nas amostras.

4.4.3. Transcrição reversa e amplificação por PCR em tempo real quantitativo

A transcrição reversa (RT) e amplificação por PCR quantitativa (PCRq) foram realizadas em um único passo, com a utilização do kit *Power SYBR® Green TRNAo-CT 1-Step* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O produto de amplificação de cada amostra foi analisado pelo sistema *SYBR®Green*. Este método utiliza fluoróforos que se intercalam na fita dupla de DNA e, ao serem excitados por luz, emitem fluorescência, sendo a intensidade desta proporcional à quantidade do produto de amplificação. A fluorescência detectada e representada por meio do ciclo limiar, *cycle threshold* (RUBINS *et al.*, 1999), que

representa o ciclo, na reação de amplificação, a partir do qual a amplificação se tornar exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical, Applied Biosystems*) para um volume final de 20 μL , como descrito na tabela 2. Uma reação sem amostra de RNA (controle negativo) foi realizada para cada par de *primers*, a fim de se verificarem possíveis contaminações, e uma reação sem a enzima transcriptase reversa foi realizada para cada par de *primers*, para certificação da ausência de possíveis contaminações com DNA genômico.

Tabela 2 - Reagentes da reação em cadeia de polimerase e suas respectivas quantidades.

Reagente	Quantidade
Mix <i>Power SYBR[®] Green RT-PCR (2x)</i>	10 μL
Transcriptase reversa	0,16 μL
RNA (5 ng/4,5 μL)	4,5 μL
<i>Primer forward</i> (5 pmol/L)	0,4 μL
<i>Primer reverse</i> (5 pmol/L)	0,4 μL
Água bidestilada	5,54 μL
Volume total	20 μL

As reações foram conduzidas em equipamento AB7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os dados obtidos analisados no programa *Software StepOne v2.1*.

A sequência dos iniciadores ou *primers* utilizados está descrita na tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos *primers* utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

Primer¹	Proteína correspondente	Sequência
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	F: 5'-CAGCACGGTGAAGCCATTC-3' R: 5'-GCGTGCATCCGCTTGTG-3'
PPAR γ	Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR γ)	F: 5'-GTGCCAGTTTCGATCCGTAGA-3' R: 5'-GGCCAGCATCGTGTAGATGA-3'
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	F: 5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3' R: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'

¹ Identificação do *primer* pelo gene correspondente
F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

As condições da reação foram às mesmas para todos os experimentos de RT-PCRq. Segue a descrição das condições de termociclagem na PCR:

- Programa de transcrição reversa: 48° C durante 30 minutos;
- Ativação da Taq DNA polimerase: 95° C durante 10 minutos;
- Quarenta ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação: 95° C durante 15 segundos (desnaturação), 60° C durante 1 minuto (anelamento e extensão);
- Programa de desnaturação ou dissociação do produto de amplificação (curvas de *melting*): foi realizado após cada reação, com o objetivo de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros de *primers* e/ou de produtos inespecíficos de amplificação. Para isso, as amostras foram submetidas a aumentos gradativos de temperatura (acréscimos de 0,3° C) de 60° C para 95° C. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce. O ponto correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação Tm (*melting temperature*) e determina o momento em que o produto de PCR apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A Tm é específica para cada sequência de DNA amplificada. Assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado. Os dados obtidos foram analisados em um gráfico da razão entre a derivada da fluorescência e a derivada da temperatura (dF / dT) em relação a temperatura.

Todos os *primers* foram validados em estudos prévios do Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol). As reações de RT-PCRq foram realizadas para os genes em estudo, utilizando-se 5 ng de RNA. A expressão relativa de RNA mensageiro para cada um dos genes alvo foi determinada método comparativo $\Delta\Delta Ct$, com normalização para o gene que codifica GAPDH, o gene referência. Para isso, os valores de Ct obtidos para cada amostra, nas reações de amplificação dos genes para TNF- α e PPAR γ , foram subtraídos do Ct obtido para as mesmas amostras, nas reações de amplificação do gene GAPDH, sendo obtido o ΔCt . A quantificação relativa de cada gene alvo foi obtida por meio do método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta Ct$. Segundo este método, a expressão relativa do gene alvo corresponde ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{intervenção}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$.

4.5. Detecção proteica (*Western Blot*)

Para os experimentos de *Western Blot* foram realizadas culturas primárias de GRDs coletados de um animal macho (aproximadamente 48 gânglios – de cervical a sacral). Após 5 dias de tratamento com paclitaxel ou seu veículo, as células foram lavadas com PBS, removidas e a extração proteica foi realizada com o tampão de lise *Radioimmunoprecipitation buffer* (RIPA – 150 mM de cloreto de sódio, 1% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% de dodecil sulfato de sódio, 50 mM de Trizma base). Ao tampão de lise foram acrescentados coquetel inibidor de protease (proporção de 1:200) e inibidores de fosfatase (de ortovanadato de sódio e pirofosfato de sódio).

Para avaliar a expressão de PPAR da amostra primeiramente foi feita a quantificação proteica total pelo método de Bradford. Para tanto, usou-se solução padrão de Albumina Sérica Bovina (BSA - 1 mg/mL) misturado à solução de Bradford. Para fazer a curva de calibração foram feitas diluições seriadas da solução padrão onde foi possível após as leituras, comparar a intensidade da absorbância da amostra e do padrão, determinando assim um valor numérico à concentração da amostra. O diluente utilizado foi água ultrapura, pois após comparação com a

solução de lise, foi verificado que não há diferença dos valores de concentração de proteínas.

O equipamento utilizado para a leitura das amostras foi o espectrofotômetro modelo DXT 800 Multimode Detector (Beckman Coulter) disponibilizado pelo Laboratório de Farmacologia Molecular. As análises foram feitas no comprimento de onda de 595 nm em placas de 96 poços.

Após a quantificação total de proteínas, iguais quantidades de cada amostra (15 µg) foram adicionadas ao tampão de amostra Laemmli (6 X) recém-preparado, contendo 5% de 2-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos para desnaturação proteica, centrifugadas por 30 segundos e submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) com gradiente de 4–12%. As proteínas então foram separadas por eletroforese como auxílio da Cuba para eletroforese (Amersham ECL Gel Box, GE Healthcare). Os géis foram submetidos a uma pré-corrída a 160 V por 12 minutos e então as amostras e o marcador de peso molecular See Blue® foram adicionados nos géis sob as seguintes condições de corrida: 100 volts por 1 hora e 40 minutos. O tampão de corrida 1X foi diluído a partir do tampão TRIS/Glicina/SDS 10X.

Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (porosidade de 0,45 µm. Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 24 volts (Trans-Blot Semi-dry Transfer Cell, Bio Rad) durante 1 hora e 30 minutos.

Para detecção do PPAR α , a membrana foi previamente incubada com solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado diluído em TBST) por 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo usado para reconhecimento específico da isoforma α dos receptores PPAR foi anticorpo primário IgG extraído de coelho anti-PPAR α , com diluição de 1:1000 em 5% em leite TBST (Sc-9000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e exposição *overnight*. A membrana então foi lavada por 3 ciclos de 10 minutos com TBST e então adicionou-se o anticorpo secundário anti-coelho IgG extraído de cabra diluído em uma razão de 1:5000 em 1% em leite TBST (Ab-6721, Abcam, Cambridge, MA, EUA) por 1 hora sob agitação.

Para a revelação, a membrana foi lavada novamente em 3 ciclos de 10 minutos com TBST e então adicionou-se 1,5 mL das soluções Intensificadora de Luminol e solução de peróxido homogeneizadas com igual proporção. Assim foi possível avaliar, por densitometria, a quantidade de proteínas presentes na amostra,

uma vez que houve substrato para a enzima conjugada ao anticorpo secundário, cujo produto é quimioluminescente e capaz de sensibilizar os filmes radiográficos (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

Para normalização dos dados usou-se como controle interno o anticorpo primário IgG anti-actina extraído de cabra com diluição de 1:1000 em 5% em leite TBST (Sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) *overnight*. Após esse período, a membrana foi lavada em 3 ciclos de 10 minutos com TBST e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário anti-cabra IgG extraído de coelho diluído em uma razão de 1:5000 em 1% em leite TBST (Sc-2768, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) por 1 hora sob agitação. Em seguida, procedeu-se novamente as etapas de revelação dos filmes em sala escura.

O software usado para quantificação das bandas dos filmes revelados foi o ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA), disponível no sítio do *National Institute of Health* (NIH).

4.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (E.P.M.) de 3 culturas diferentes para os experimentos de detecção proteica e de 2 culturas diferentes para os experimentos de expressão gênica. A análise dos resultados foi feita através do programa Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os tratamentos foram comparados por meio do teste *t* de Student. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Estabelecimento de cultura primária de células do Gânglio da Raiz Dorsal

Foram estabelecidas culturas primárias para os experimentos de determinação proteica e RT-PCRq. Os neurônios apresentam-se com tamanhos variados, de formato arredondado destacando-se das demais células devido sua refringência e a presença de neuritos (figura 9, B). Além disso, observa-se a presença de células não-neuronais com aspecto alongado e fusiforme (glia e fibroblastos) já no 3º dia de cultura.

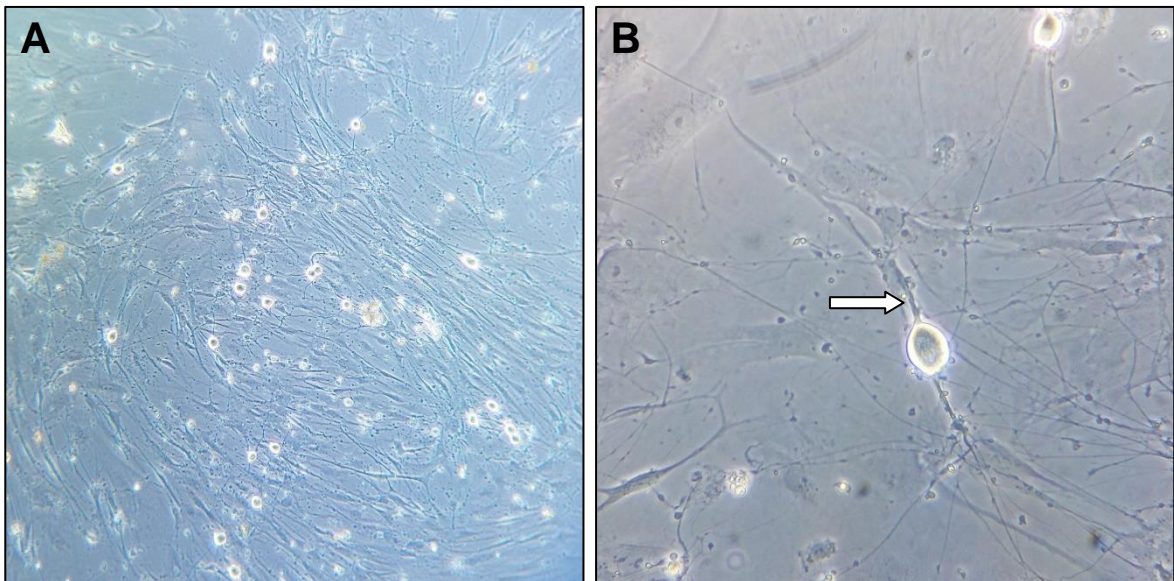


Figura 9 - Aspecto morfológico da cultura de células do GRD. A – Cultura de 10 dias apresentando células neuronais e não neuronais em aumento de 100 vezes. B – Aspecto do neurônio após 10 dias de cultura evidenciando a presença de neuritos (seta branca) em aumento de 400 vezes. Microscopia invertida com contraste de fase.

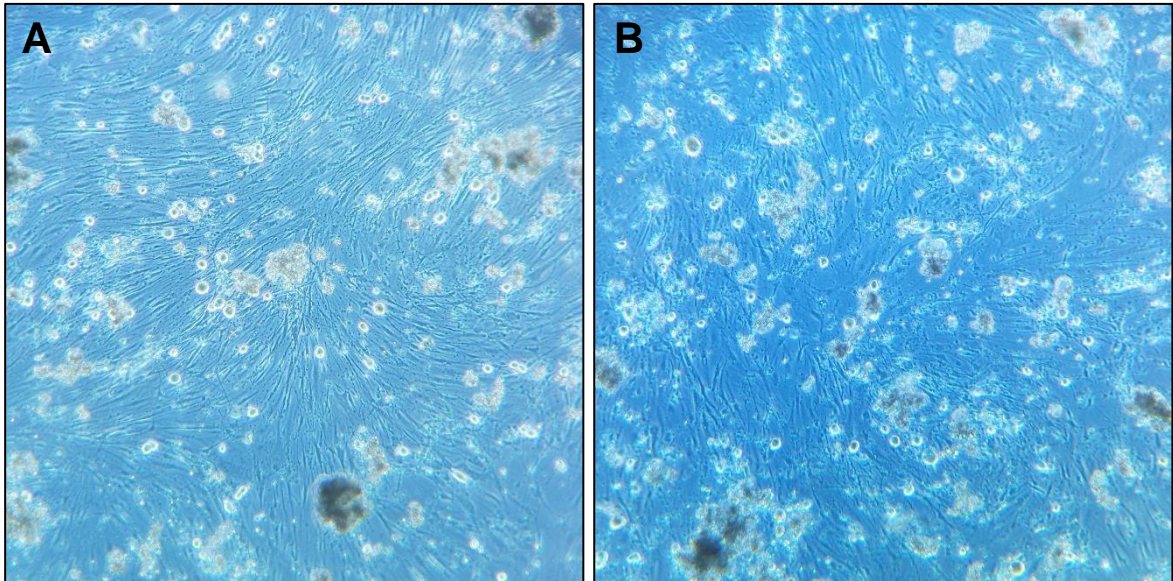


Figura 10 - Aspecto morfológico da cultura de células do GRD após tratamento. A – Cultura do pool de células de dois animais no 12^o dia apresentando células neuronais e não neuronais tratadas com DMSO, em aumento de 100 vezes. B – Cultura do pool de células de dois animais no 10^o dia apresentando células neuronais e não neuronais tratadas com paclitaxel (300 nM) em aumento de 100 vezes. Microscopia invertida com contraste de fase.

5.2. Efeito do tratamento com Paclitaxel sobre a expressão gênica de PPAR e TNF- α em células do gânglio da raiz dorsal

Para avaliar o efeito do tratamento com Paclitaxel sobre a expressão de PPAR e TNF- α em culturas de células de GRD inicialmente foi feita a extração do RNA total.

Os dados de expressão gênica relativa foram precedidos da análise da pureza e integridade do RNA extraído e os resultados estão demonstrados na Tabela 4, juntamente com a apresentação dos valores da quantificação final do tRNA, expressa em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os resultados obtidos demonstraram que o tRNA extraído está dentro da faixa de pureza aceitável, cujo valor satisfatório deve ser $>1,6$ e $< 2,2$.

Tabela 4 - Leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm das amostras de tRNA e apresentação do grau de pureza e quantificação final do tRNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Amostras	Abs. 260 nm	Abs. 280 nm	Teste de pureza Razão 260/280	Concentração final de tRNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
DMSO	22,31	13,28	1,743	0,847
Paclitaxel	18,46	11,00	1,723	0,711
DMSO	21,40	12,04	1,797	0,844
Paclitaxel	18,93	10,87	1,821	0,715

A integridade do RNA extraído foi determinada pela análise qualitativa das subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal, após eletroforese das amostras em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. A amostra observada na luz ultravioleta permitiu visualizar as duas subunidades, 28 e 18S. Além disso, não foram observados rastros de degradação abaixo das subunidades, confirmando, assim, integridade de cada uma delas (Figura 11).

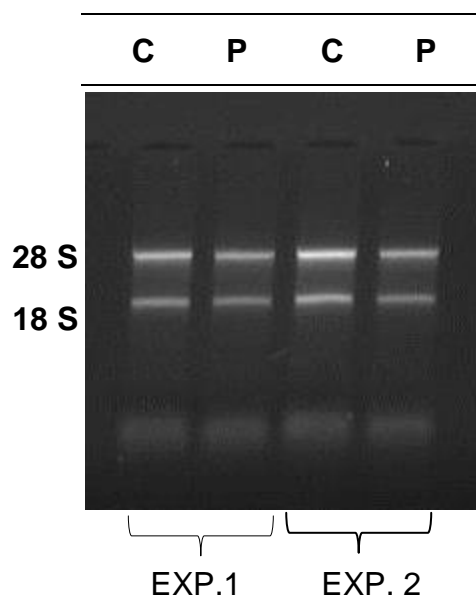


Figura 11 - Análise da integridade das subunidades 28S e 18S das amostras de RNA total. As amostras de RNA total foram obtidas de células do gânglio da raiz dorsal, Grupos experimentais: C - controle (DMSO), P - paclitaxel (300 nM), EXP – experimento.

Com o intuito de verificar a funcionalidade e especificidade dos *primers* desenhados para este estudo foi realizado um teste prévio avaliando a curva amplificação pela PCRq e especificidade através da curva de dissociação (curvas de *melting*) para todos os *primers* (GAPDH, TNF- α e PPAR γ). O PPAR γ foi escolhido em detrimento às outras isoformas de PPAR em função de validação prévia no laboratório. As figuras 12A, 13A e 14A demonstram as curvas de amplificação de *primers* sendo caracterizado o ponto de início de emissão de fluorescência, Ct. Além disso, as diferenças mínimas entre os valores de Ct dentro de cada gene analisado indicam a presença de quantidades iniciais de DNA semelhantes e que não ocorreram erros manuais, como de pipetagem, durante a realização do procedimento. As curvas de dissociação do produto de amplificação de todos os *primers* estudados demonstram a presença de um único pico na curva, indicando amplificação específica de um único fragmento de DNA e ausência de formação de dímeros de *primers* ou de produtos inespecíficos de amplificação, os quais poderiam interferir na quantificação real do transcrito alvo. Estes resultados estão demonstrados nas figuras 12B (GAPDH), 13B (TNF- α) e 14B (PPAR γ).

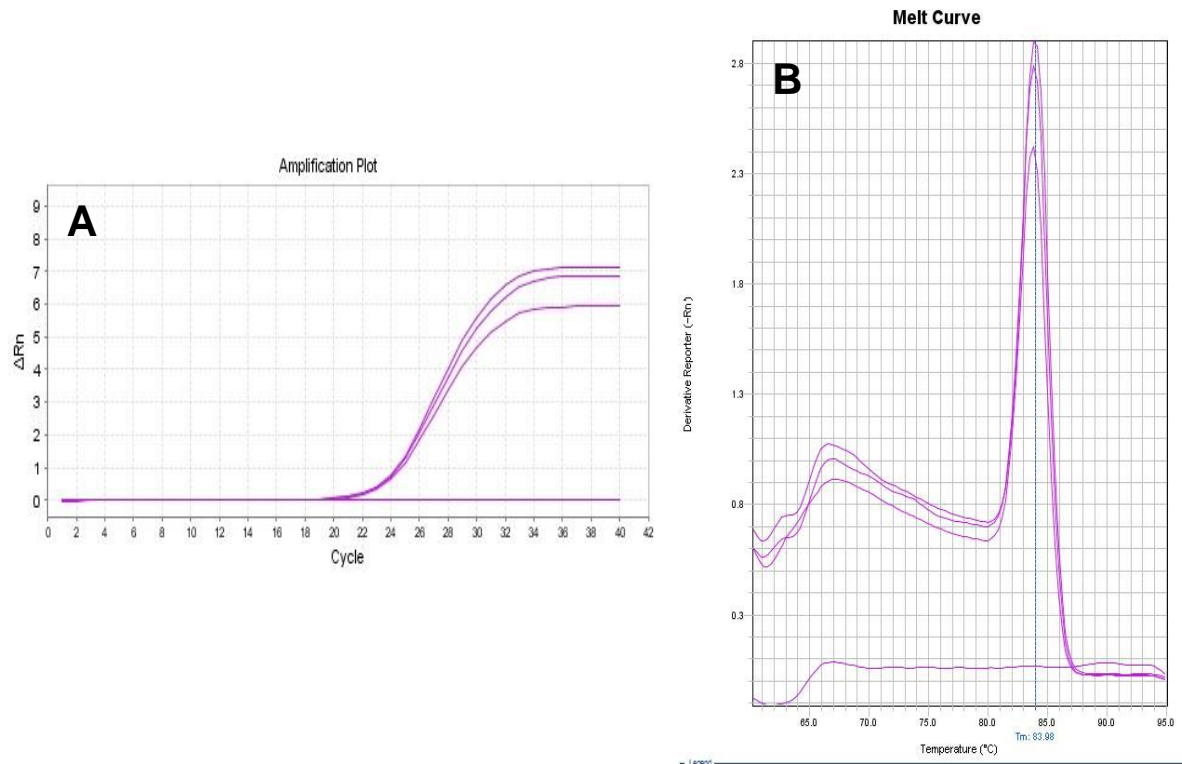


Figura 12 - Avaliação de amplificação e especificidade da sequência de *primer* para gene GAPDH. A amplificação do gene GAPDH foi realizada em triplicata com semelhante quantidade inicial de DNA em cada amostra, o gene GAPDH amplificou em CT = 24,69; 24,77 e 24,95 ciclos. A- Teste de amplificação e B- Curva de *melting*.

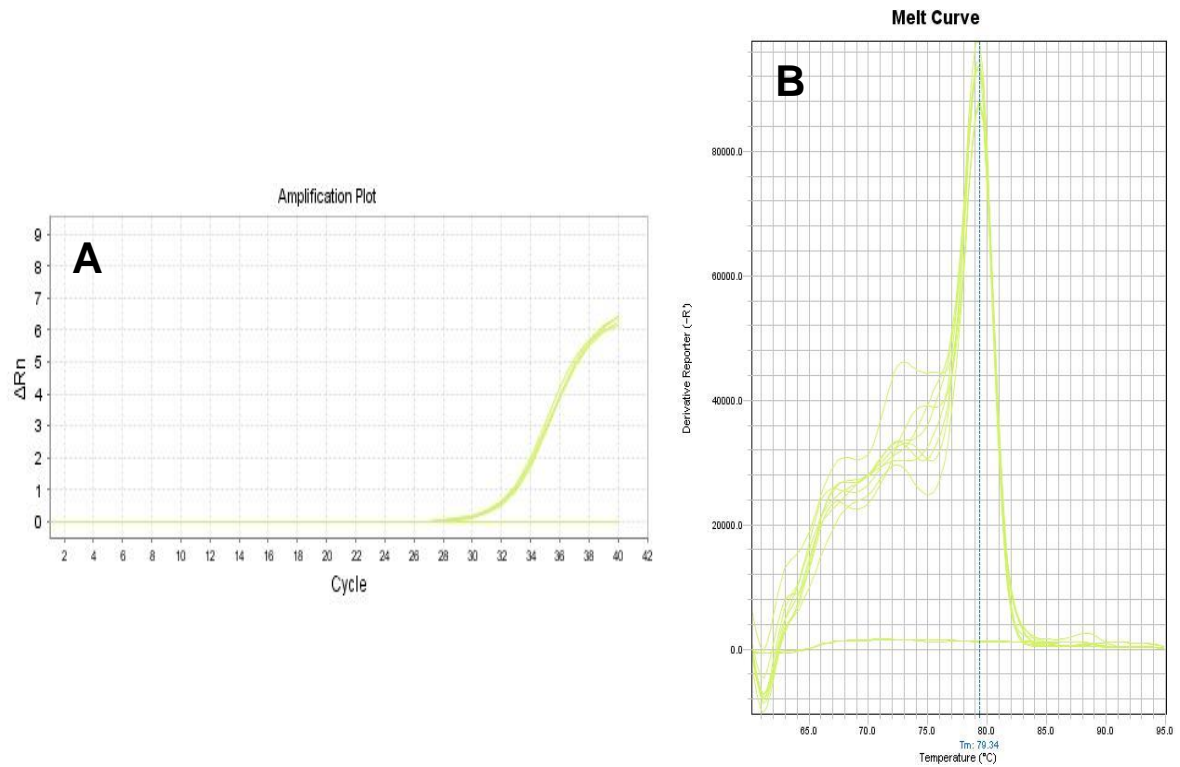


Figura 13 - Avaliação de amplificação e especificidade da sequência de *primer para* gene TNF- α . A amplificação do gene TNF- α foi realizada com semelhante quantidade inicial de DNA em cada amostra, o gene TNF- α amplificou em CT = 32,88; 32,54; 32,72; 32,46; 32,85; 32,69; 32,94 e 32,77 ciclos. A- Teste de amplificação e B- Curva de *melting*.

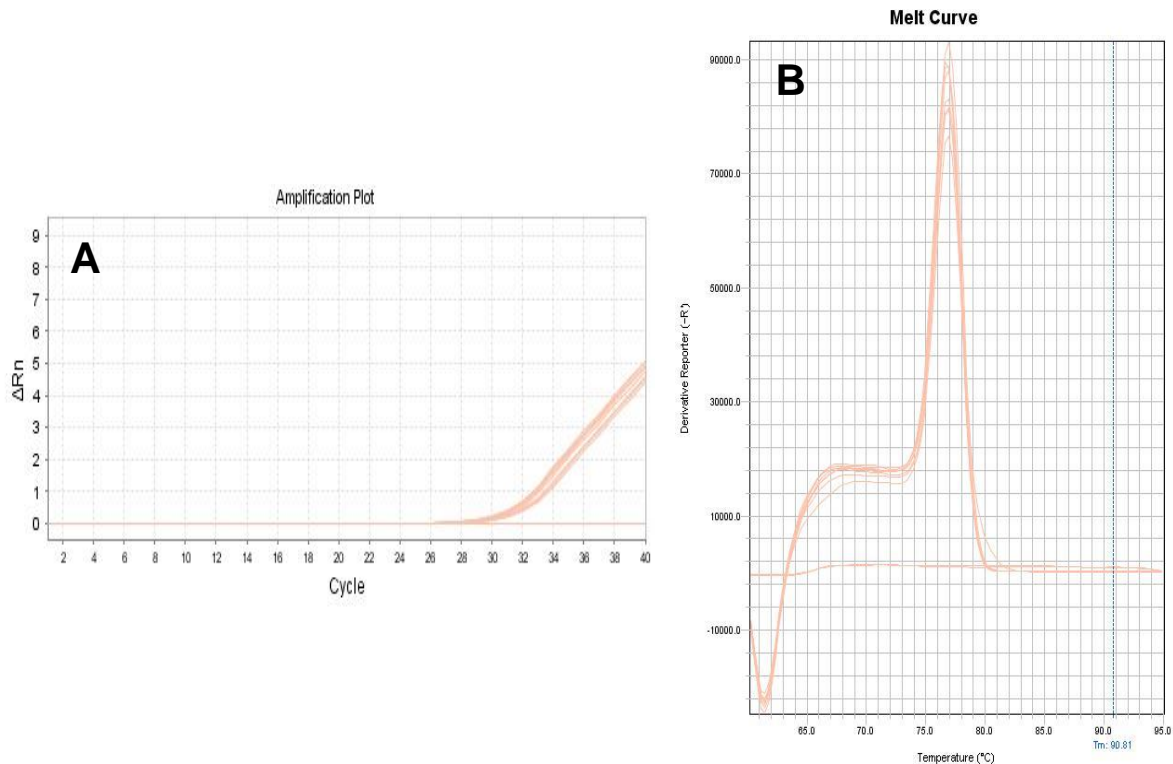
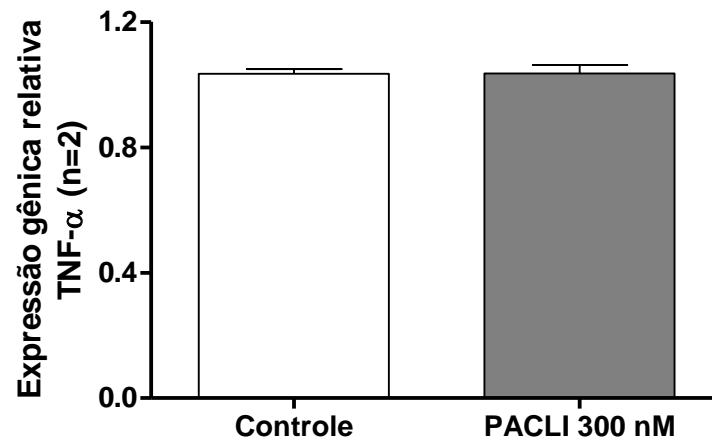


Figura 14 - Avaliação de amplificação e especificidade da sequência de *primer* para gene PPAR γ . A amplificação do gene PPAR γ foi realizada com semelhante quantidade inicial de DNA em cada amostra, o gene PPAR γ amplificou em CT = 30,77; 31,06; 30,97; 30,47; 30,00; 30,32; 30,24 e 30,04 ciclos. B- Teste de amplificação e B- Curva de *melting*.

A figura 15A mostra que não houve diferença na expressão de RNA mensageiro de TNF- α nas células da cultura de gânglio da raiz dorsal que receberam tratamento com 300 nM de paclitaxel quando comparado ao grupo controle (DMSO). Da mesma forma, não houve diferença na expressão de RNA mensageiro de PPAR γ dessas células quando receberam o mesmo tratamento (Figura 15B).

A)



B)

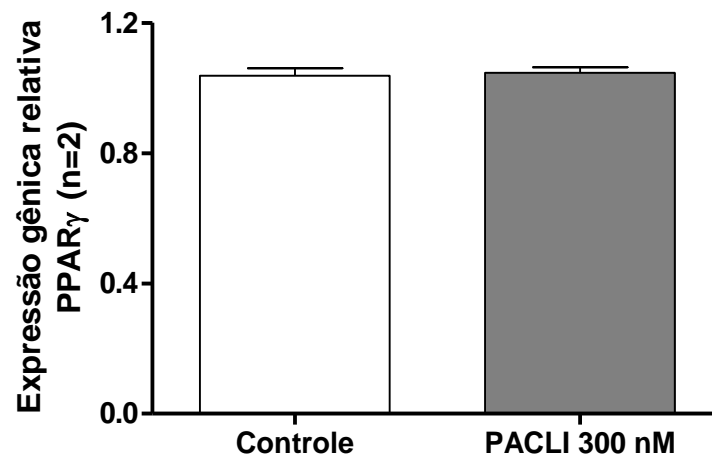


Figura 15: Expressão gênica relativa do RNA mensageiro da citocina próinflamatória TNF- α e do PPAR γ em cultura de células do gânglio da raiz dorsal. As células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços e tratadas com veículo (DMSO) ou Paclitaxel (300 nM) por 5 dias. A- Expressão relativa de TNF- α . B- Expressão relativa de PPAR γ . Dados expressos como média \pm EPM.

5.3. Efeito do tratamento com Paclitaxel sobre a expressão proteica de PPAR α em células do gânglio da raiz dorsal

Para avaliar se o tratamento com paclitaxel altera a expressão proteica de receptores PPAR em cultura de células de GRD inicialmente foi realizada quantificação de proteínas totais de amostras das culturas. Os experimentos foram repetidos com células provenientes de 3 animais diferentes para controle de potencial variabilidade entre as culturas. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração de proteínas após leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm das amostras tratadas com Paclitaxel e DMSO ($\mu\text{g/mL}$)

Experimento	Amostra	Concentração de Proteínas
Experimento controle	F12	720,744
	DMSO	729,211
Experimento 1	DMSO	722,551
	Paclitaxel	628,559
Experimento 2	DMSO	678,124
	Paclitaxel	722,551
Experimento 3	DMSO	583,084
	Paclitaxel	625,799

A análise da expressão proteica de PPAR β/δ não foi avaliada na cultura de GRD pela indisponibilidade do anticorpo primário no FarMol no momento da elaboração do projeto deste trabalho. Em relação ao anticorpo anti-PPAR γ , os experimentos foram realizados, porém, não houve tempo hábil para a padronização deste, visto que houve mudança de marca dos anticorpos utilizados necessitando assim de adequação.

Como mostra na figura 16, o tratamento com 300 nM de paclitaxel por 5 dias não alterou a expressão de PPAR α nas células do GRD, quando comparado com o tratamento de DMSO pelo mesmo tempo.

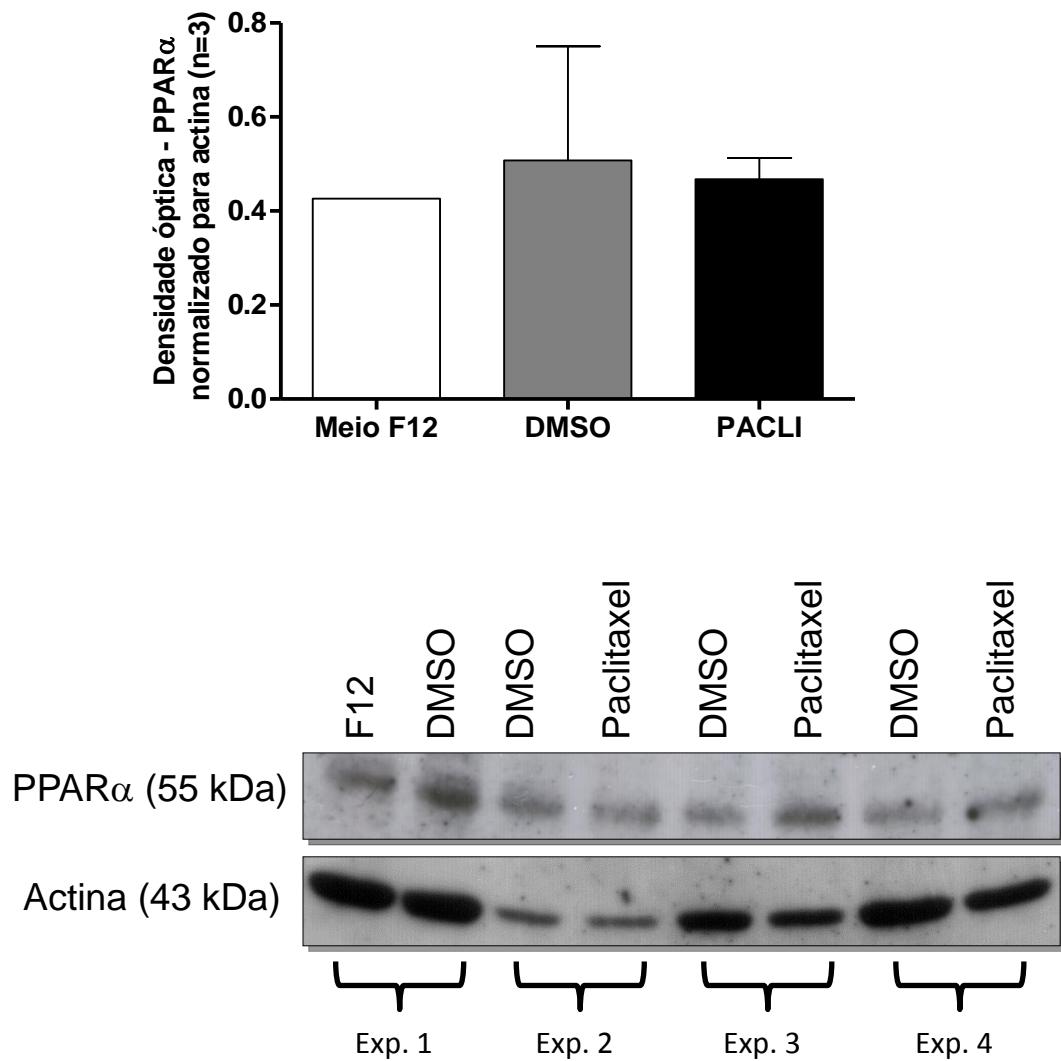


Figura 16 - Efeito do tratamento com Paclitaxel na expressão de PPAR α e quantificação densitométrica de PPAR α . Razão entre o valor de densidade da expressão de α e o valor de densidade para a expressão de actina. Valores estão expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes.

6. DISCUSSÃO

Estudos *in vitro* de neurotoxicidade causada pelo paclitaxel são um importante instrumento para a avaliação dos mecanismos pelos quais essa droga induz neuropatia periférica. Igualmente, é possível avaliar novas estratégias para prevenir e/ou tratar efeitos adversos do paclitaxel. Além disso, realizar estudos *in vitro* que precedem os estudos *in vivo* obedece a política dos 3Rs (reduce, reuse and refinement) instituída pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea).

Para cumprir com os objetivos propostos, culturas de células primárias do gânglio da raiz dorsal de ratos foram estabelecidas durante o período de execução deste trabalho. Foram utilizados ratos machos e fêmeas, já que não foram observadas diferenças na expressão de PPAR γ em estudos realizados previamente em nosso laboratório (dados não publicados). Além disso, é importante ressaltar que cultura de primária de células de GRD é uma cultura mista, i.e., formada por neurônios e células não-neuronais. A interpretação de qualquer resultado proveniente destas culturas deve levar em consideração que os efeitos observados podem ter sido obtidos tanto de alterações em neurônios, como em células da glia, por exemplo.

Com o intuito de avaliar o efeito do paclitaxel na expressão de PPAR e de citocinas pró-inflamatórias, utilizamos a concentração publicada por Pittman e colaboradores (2014). Estes autores demonstraram que o tratamento com 300 nM de paclitaxel diminui a liberação do neuropeptídeo CGRP induzida pela capsaicina, indicando alteração na função de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro. No entanto, nossos resultados não demonstraram nenhum efeito modulador sobre a expressão de PPAR γ ou PPAR α quando utilizamos a concentração de paclitaxel supracitada. Estes resultados podem indicar que a concentração de paclitaxel utilizada pode produzir mudanças pós-translacionais em células de GRD, o que ocasionaria alteração na função neuronal (diminuição da liberação de CGRP), mas não altera atividades transcricionais.

Avaliar a expressão de PPAR em células tratadas com paclitaxel foi necessária porque se esta droga modulasse negativamente a expressão destes receptores, a interpretação de estudos futuros quanto ao uso de agonistas de PPAR

com intuito de produzir neuroproteção poderia ser equivocada. Primeiro, porque existem poucos estudos mostrando o padrão de expressão de receptores PPAR em culturas de neurônios sensoriais. Segundo, porque se a ativação de PPAR γ , por exemplo, não produzisse alterações no desenho experimental aqui sugerido, a diminuição da expressão destes receptores poderia influenciar a interpretação de resultados negativos que pudessem ser obtidos.

É sabido que drogas e outros xenobióticos, podem modular a atividade regulatória dos PPARs (PETERS et al., 2012). Park e colaboradores (2007) observaram que o pré-tratamento com pioglitazona, um sensibilizador de insulina pertencente à classe das tiazolidinedionas, previne dano neuronal, disfunção motora, perda de mielina, diminuição da inflamação e da hiperalgesia térmica induzida por injúria da medula espinhal.

Também com o propósito de modular a atividade dos PPARs, Zanardelli e colaboradores (2014) mostraram que a rosiglitazona, outro agonista de PPAR γ , reduz a neuropatia periférica induzida por oxaliplatina. Essa análise foi feita através de testes comportamentais, tais como o teste Rota-Rod e teste de pressão da pata. A conclusão do grupo foi, portanto, que a neurotoxicidade induzida pela administração da oxaliplatina altera a funcionalidade peroxissomal e que a rosiglitazona previne esse efeito, assim como a dor. Embora não tenha sido objeto de estudo deste trabalho, os resultados supracitados demonstram que a hipótese de induzir neuroproteção pela ativação de PPAR é plausível, já que este efeito pode ser observado em modelo de neuropatia induzido por derivados de platina.

Um efeito importante da ativação das isoformas de PPARs é a supressão do estresse oxidativo e também de processos inflamatórios (MORAES et al., 2006). Infere-se dessa forma que existe associação entre as células do sistema imunológico e os PPARs. Siau e colaboradores (2006) mostraram que há envolvimento dessas células na neuropatia periférica, pois constataram ativação células de Langerhans na pele, quando submeteram ratos à exposição intraperitoneal de paclitaxel. Nesse mesmo trabalho, mostraram que com o referido tratamento, há degeneração das fibras nervosas terminais intraepidermais dos animais. Findaboylu e colaboradores (2011) também demonstraram que o tratamento com inibidores da formação de espécies reativas de oxigênio diminuía a resposta nociceptiva induzida pelo paclitaxel.

Uma vez demonstrada a ausência de modulação da expressão de receptores PPAR, a próxima pergunta foi avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias após o tratamento com paclitaxel. Visto que o TNF- α produzido pela glia ativada é crítico no estabelecimento e manutenção da dor neuropática em modelos animais (MARCHAND; PERRETTI; MCMAHON, 2005; MOALEM; TRACEY, 2006; WATKINS; MAIER, 2003), e já havia padronização/validação dos *primers* para esta citocina em nosso laboratório, optamos pela análise da expressão de RNA mensageiro da mesma. O tratamento com 300 nM de paclitaxel não alterou a expressão de TNF- α em cultura de células de GRD quando comparado ao grupo controle. Diferentemente, Ledebøer e colaboradores (2007) observaram que injeções intraperitoneais de paclitaxel em ratos adultos da linhagem Sprague-Dawley induzem a expressão de RNA mensageiro das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β em GRD lombares. Esse dado contrasta com os apresentados nesse trabalho, porém acreditamos que as diferenças nas concentrações da droga utilizadas, bem como o modelo experimental utilizado (tratamento *in vivo*) possam corroborar para a discrepância observada.

Outros efeitos já foram descritos para explicar a NPIP. Na literatura foi relatado que o paclitaxel tem efeito excitatório direto na liberação de neuropeptídeos (MATERAZZI et al., 2012; MIYANO et al., 2009). Quando animais são expostos ao tratamento prolongado com paclitaxel (9 semanas) e como consequência apresentam neuropatia periférica induzida por esse, a expressão do neuropeptídeo Y aumenta (JAMIESON et al., 2007). Esse aumento na expressão de neuropeptídeos pode contribuir para um “ganho de função” dos neurônios sensoriais primários, manifestado no paciente como alodinia mecânica e formigamento (DOUGHERTY et al., 2004; FORSYTH et al., 1997; LIPTON et al., 1989; WIERNIK et al., 1987).

À vista desse fato, os resultados apresentados serão utilizados em experimentos futuros para testar a hipótese de que a ativação dos PPAR pode ser neuroprotetora em modelo de neurotoxicidade induzida pelo paclitaxel.

7. CONCLUSÕES.

A terapia quimioterápica é uma importante estratégia farmacológica no combate ao câncer. Embora este tratamento tenha propiciado o aumento da sobrevida dos pacientes, ele ainda apresenta efeitos adversos que podem diminuir drasticamente a qualidade de vida das pessoas tratadas. O paclitaxel, uma das drogas utilizadas no manejo do câncer, traz consigo um efeito adverso importante, a neuropatia periférica. Busca-se hoje então, estratégias que possam prevenir e/ou tratar esse efeito adverso, como a neuroproteção.

O paclitaxel não alterou a expressão de RNA mensageiro de TNF- α e dos receptores PPAR γ , bem como a expressão proteica de PPAR α neste modelo de cultura de células.

Estes resultados contribuem para o entendimento da neurotoxicidade induzida pelo paclitaxel e serão utilizados em futuros estudos para avaliar se a ativação de PPAR induz neuroproteção em nosso modelo de neuropatia periférica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSANDRI-HABER, N. et al. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. **J Neurosci**, v. 28, n. 5, p. 1046-57, Jan 30 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) – Consulta de produto – Medicamento. Disponível em <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp>. Acesso em 19 de abr. 2015.

AUBOEUF, D. et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. **Diabetes**, v. 46, n. 8, p. 1319-27, Aug 1997.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 409-35, 2002.

BERGER, J. P.; AKIYAMA, T. E.; MEINKE, P. T. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 5, p. 244-51, May 2005.

BOEHMERLE, W. et al. Chronic exposure to paclitaxel diminishes phosphoinositide signaling by calpain-mediated neuronal calcium sensor-1 degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 26, p. 11103-8, Jun 26 2007.

BOKEMEYER, C. et al. Epirubicin/dacarbazine rapidly alternated with ifosfamide in the treatment of metastatic soft tissue sarcomas. **Ann Oncol**, v. 3, n. 6, p. 487-8, Jun 1992.

BOURGUET, W.; GERMAIN, P.; GRONEMEYER, H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 10, p. 381-8, Oct 2000.

BRAISSANT, O. et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 354-66, Jan 1996.

BRASIL. **Formulário Terapêutico Nacional 2010: RENAME 2010**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.1135 p.

BRUNTON, L.L. CHABNER, B.A. KNOLLMAN, B. C. **Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Porto Alegre: McGraw Hill, 2012.2080 p.

BURKEY, T. H.; HINGTGEN, C. M.; VASKO, M. R. Isolation and culture of sensory neurons from the dorsal-root ganglia of embryonic or adult rats. **Methods Mol Med**, v. 99, p. 189-202, 2004.

CAMIDGE, R. The Story of Taxol: Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-Cancer Drug. **BMJ : British Medical Journal**, v. 323, n. 7304, p. 115-115, 2001.

CAROZZI, V. A. et al. Glutamate carboxypeptidase inhibition reduces the severity of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in rat. **Neurotox Res**, v. 17, n. 4, p. 380-91, May 2010.

CAVALETTI, G.; ALBERTI, P.; MARMIROLI, P. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in the era of pharmacogenomics. **Lancet Oncol**, v. 12, n. 12, p. 1151-61, Nov 2011.

CAVALETTI, G. et al. Peripheral neurotoxicity of taxol in patients previously treated with cisplatin. **Cancer**, v. 75, n. 5, p. 1141-50, Mar 1 1995.

CAVALETTI, G. et al. Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration. **Neurotoxicology**, v. 21, n. 3, p. 389-93, Jun 2000.

CAVALETTI, G.; MARMIROLI, P. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. **Nat Rev Neurol**, v. 6, n. 12, p. 657-66, Dec 2010.

CHAUDHRY, V. et al. Toxic neuropathy in patients with pre-existing neuropathy. **Neurology**, v. 60, n. 2, p. 337-40, Jan 28 2003.

CHABNER, B.A.; LONGO, D.L. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. 2^a ed. Filadélfia: LWW, 1996. 824 p.

CIMINI, A. et al. PPARgamma-dependent effects of conjugated linoleic acid on the human glioblastoma cell line (ADF). **Int J Cancer**, v. 117, n. 6, p. 923-33, Dec 20 2005.

COLL, T. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. **Curr Mol Pharmacol**, v. 2, n. 1, p. 46-55, Jan 2009.

CONNELLY, E. et al. Paclitaxel delivered as a 3-hr infusion with cisplatin in patients with gynecologic cancers: unexpected incidence of neurotoxicity. **Gynecol Oncol**, v. 62, n. 2, p. 166-8, Aug 1996.

CRESTEIL, T. et al. Taxol metabolism by human liver microsomes: identification of cytochrome P450 isozymes involved in its biotransformation. **Cancer Res**, v. 54, n. 2, p. 386-92, Jan 15 1994.

DELERIVE, P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. **J Biol Chem**, v. 274, n. 45, p. 32048-54, Nov 5 1999.

DELERIVE, P.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. **J Endocrinol**, v. 169, n. 3, p. 453-9, Jun 2001.

DELERIVE, P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. **Circ Res**, v. 85, n. 5, p. 394-402, Sep 3 1999.

DEVCHAND, P. R. et al. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 39-43, Nov 7 1996.

DOUGHERTY, P. M. et al. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. **Pain**, v. 109, n. 1-2, p. 132-42, May 2004.

DREYER, C. et al. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, v. 68, n. 5, p. 879-87, Mar 6 1992.

DYE, R. B.; FINK, S. P.; WILLIAMS, R. C., JR. Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. **J Biol Chem**, v. 268, n. 10, p. 6847-50, Apr 5 1993.

ELBRECHT, A. et al. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 224, n. 2, p. 431-7, Jul 16 1996.

ESCHER, P. et al. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4195-202, Oct 2001.

FAJAS, L. et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. **J Biol Chem**, v. 272, n. 30, p. 18779-89, Jul 25 1997.

FIDANBOYLU, M.; GRIFFITHS, L. A.; FLATTERS, S. J. Global inhibition of reactive oxygen species (ROS) inhibits paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25212, 2011.

FLATTERS, S. J.; BENNETT, G. J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain**, v. 122, n. 3, p. 245-57, Jun 2006.

FORSYTH, P. A. et al. Prospective study of paclitaxel-induced peripheral neuropathy with quantitative sensory testing. **J Neurooncol**, v. 35, n. 1, p. 47-53, Oct 1997.

GHELARDINI, C. et al. Effects of a new potent analog of tocainide on hNav1.7 sodium channels and in vivo neuropathic pain models. **Neuroscience**, v. 169, n. 2, p. 863-73, Aug 25 2010.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 918-34, Mar 19 2010.

GORNSTEIN, E.; SCHWARZ, T. L. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. **Neuropharmacology**, v. 76 Pt A, p. 175-83, Jan 2014.

GOTTLICHER, M. et al. Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 10, p. 4653-7, May 15 1992.

GRISOLD, W.; CAVALETTI, G.; WINDEBANK, A. J. Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention. **Neuro Oncol**, v. 14 Suppl 4, p. iv45-54, Sep 2012.

GUAN, Y. et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 Pt 2, p. F1013-22, Dec 1997.

GUASTALLA, J. P. et al. Efficacy and safety of the paclitaxel and carboplatin combination in patients with previously treated advanced ovarian carcinoma. A multicenter GINECO (Group d'Investigateurs Nationaux pour l'Etude des Cancers Ovariens) phase II study. **Ann Oncol**, v. 9, n. 1, p. 37-43, Jan 1998.

HARRIS, J. W. et al. Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3A4 and an unknown P450 enzyme. **Cancer Res**, v. 54, n. 15, p. 4026-35, Aug 1 1994.

HENEKA, M. T.; KLOCKGETHER, T.; FEINSTEIN, D. L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. **J Neurosci**, v. 20, n. 18, p. 6862-7, Sep 15 2000.

HENEKA, M. T.; LANDRETH, G. E. PPARs in the brain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, n. 8, p. 1031-45, Aug 2007.

HERSHMAN, D. L. et al. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 18, p. 1941-67, Jun 20 2014.

INESTROSA, N. C. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents beta-amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling. **Exp Cell Res**, v. 304, n. 1, p. 91-104, Mar 10 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Oncologia**: Manual de Bases Técnicas da Oncologia – SAI/SUS. 19ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 127 p.

ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645-50, Oct 18 1990.

JAMIESON, S. M. et al. Nucleolar enlargement, nuclear eccentricity and altered cell body immunostaining characteristics of large-sized sensory neurons following treatment of rats with paclitaxel. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 6, p. 1092-8, Nov 2007.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82-6, Jan 1 1998.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253-65, Apr 2004.

KEARNS, C. M. Pharmacokinetics of the taxanes. **Pharmacotherapy**, v. 17, n. 5 Pt 2, p. 105S-109S, Sep-Oct 1997.

KIM, H. K. et al. Phenyl N-tert-butyl nitron, a free radical scavenger, reduces mechanical allodynia in chemotherapy-induced neuropathic pain in rats. **Anesthesiology**, v. 112, n. 2, p. 432-9, Feb 2010.

KINGSTON, D. G. Recent advances in the chemistry of taxol. **J Nat Prod**, v. 63, n. 5, p. 726-34, May 2000.

KOSTADINOVA, R.; WAHLI, W.; MICHALIK, L. PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. **Curr Med Chem**, v. 12, n. 25, p. 2995-3009, 2005.

KREMARIK-BOUILLAUD, P.; SCHOHN, H.; DAUCA, M. Regional distribution of PPARbeta in the cerebellum of the rat. **J Chem Neuroanat**, v. 19, n. 4, p. 225-32, Sep 2000.

LEDEBOER, A. et al. Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 5, p. 686-98, Jul 2007.

LEE, J. J.; SWAIN, S. M. Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 10, p. 1633-42, Apr 1 2006.

LEONE, R. et al. Influence of glutathione administration on the disposition of free and total platinum in patients after administration of cisplatin. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 29, n. 5, p. 385-90, 1992.

LIM, H. J. et al. PPARdelta ligand L-165041 ameliorates Western diet-induced hepatic lipid accumulation and inflammation in LDLR^{-/-} mice. **Eur J Pharmacol**, v. 622, n. 1-3, p. 45-51, Nov 10 2009.

LIPTON, R. B. et al. Taxol produces a predominantly sensory neuropathy. **Neurology**, v. 39, n. 3, p. 368-73, Mar 1989.

LIU, S. et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor δ/β in hepatic metabolic regulation. **J Biol Chem**, v. 286, n. 2, p. 1237-47, Jan 14 2011.

MANFREDI, J. J.; HORWITZ, S. B. Taxol: an antimitotic agent with a new mechanism of action. **Pharmacol Ther**, v. 25, n. 1, p. 83-125, 1984.

MANGELSDORF, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-9, Dec 15 1995.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 521-32, Jul 2005.

MATERAZZI, S. et al. TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. **Pflugers Arch**, v. 463, n. 4, p. 561-9, Apr 2012.

MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. **Endocr Rev**, v. 20, n. 3, p. 321-44, Jun 1999.

MICHALIK, L.; WAHLI, W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. **J Clin Invest**, v. 116, n. 3, p. 598-606, Mar 2006.

MIELKE, S.; SPARREBOOM, A.; MROSS, K. Peripheral neuropathy: a persisting challenge in paclitaxel-based regimes. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 1, p. 24-30, Jan 2006.

MIYANO, K. et al. Paclitaxel and vinorelbine, evoked the release of substance P from cultured rat dorsal root ganglion cells through different PKC isoform-sensitive ion channels. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 1, p. 25-32, Jul 2009.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Res Rev**, v. 51, n. 2, p. 240-64, Aug 2006.

MONSARRAT, B. et al. Taxol metabolism. Isolation and identification of three major metabolites of taxol in rat bile. **Drug Metab Dispos**, v. 18, n. 6, p. 895-901, Nov-Dec 1990.

MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacol Ther**, v. 110, n. 3, p. 371-85, Jun 2006.

MORAS, D.; GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. **Curr Opin Cell Biol**, v. 10, n. 3, p. 384-91, Jun 1998.

NAGASAWA, T. et al. Effects of bezafibrate, PPAR pan-agonist, and GW501516, PPARdelta agonist, on development of steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. **Eur J Pharmacol**, v. 536, n. 1-2, p. 182-91, Apr 24 2006.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN) – Clinical Practice Guidelines in Oncology – Breast cancer. Disponível em <http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site> Acesso em: 18 de abr. 2015

NIETO, F. R. et al. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 520-31, Jul 31 2008.

NOGALES, E.; WOLF, S. G.; DOWNING, K. H. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. **Nature**, v. 391, n. 6663, p. 199-203, Jan 8 1998.

PANDEY, R. C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. **Med Res Rev**, v. 18, n. 5, p. 333-46, Sep 1998.

PARK, K. S. et al. Neuronal differentiation of embryonic midbrain cells by upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via the JNK-dependent pathway. **Exp Cell Res**, v. 297, n. 2, p. 424-33, Jul 15 2004.

PARK, S. B. et al. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 29, p. 3081-94, 2008.

PARK, S. W. et al. Thiazolidinedione class of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists prevents neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain, and inflammation after spinal cord injury in adult rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 320, n. 3, p. 1002-12, Mar 2007.

PASCUAL, D. et al. Antinociceptive effect of three common analgesic drugs on peripheral neuropathy induced by paclitaxel in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 95, n. 3, p. 331-7, May 2010.

PETERS, J. M.; SHAH, Y. M.; GONZALEZ, F. J. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 3, p. 181-95, Mar 2012.

PIGNATA, S. et al. Residual neurotoxicity in ovarian cancer patients in clinical remission after first-line chemotherapy with carboplatin and paclitaxel: the Multicenter Italian Trial in Ovarian cancer (MITO-4) retrospective study. **BMC Cancer**, v. 6, p. 5, 2006.

PITTMAN, S. K. et al. Paclitaxel alters the evoked release of calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons in culture. **Exp Neurol**, v. 253, p. 146-53, Mar 2014.

RAHMAN, A. et al. Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. **Cancer Res**, v. 54, n. 21, p. 5543-6, Nov 1 1994.

RAMANAN, S. et al. Role of PPARs in Radiation-Induced Brain Injury. **PPAR Res**, v. 2010, p. 234975, 2010.

RINGEL, I.; HORWITZ, S. B. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **J Natl Cancer Inst**, v. 83, n. 4, p. 288-91, Feb 20 1991.

RUBINS, H. B. et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. **N Engl J Med**, v. 341, n. 6, p. 410-8, Aug 5 1999.

SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, v. 277, n. 5698, p. 665-7, Feb 22 1979.

SHAN, W. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta protects against chemically induced liver toxicity in mice. **Hepatology**, v. 47, n. 1, p. 225-35, Jan 2008.

SHAN, W. et al. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) attenuates carbon tetrachloride hepatotoxicity by downregulating proinflammatory gene expression. **Toxicol Sci**, v. 105, n. 2, p. 418-28, Oct 2008.

SHER, T. et al. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. **Biochemistry**, v. 32, n. 21, p. 5598-604, Jun 1 1993.

SIAU, C.; BENNETT, G. J. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. **Anesth Analg**, v. 102, n. 5, p. 1485-90, May 2006.

SIAU, C.; XIAO, W.; BENNETT, G. J. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. **Exp Neurol**, v. 201, n. 2, p. 507-14, Oct 2006.

SIMÃO, D.A.S. Et al. Instrumentos de avaliação da neuropatia periférica induzida por quimioterapia: revisão integrativa e implicações para a prática de enfermagem oncológica. **remE- Rev. Min. Enferm**, v. 16, n. 4, p. 609-615, out./dez., 2012

TAYLOR, B. K. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists inhibit inflammatory edema and hyperalgesia. **Inflammation**, v. 26, n. 3, p. 121-7, Jun 2002.

TONTONOZ, P. et al. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes Dev**, v. 8, n. 10, p. 1224-34, May 15 1994.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1147-56, Dec 30 1994.

WAHLI, W.; BRAISSANT, O.; DESVERGNE, B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. **Chem Biol**, v. 2, n. 5, p. 261-6, May 1995.

WALLE, T. et al. Taxol metabolism and disposition in cancer patients. **Drug Metab Dispos**, v. 23, n. 4, p. 506-12, Apr 1995.

WANI, M. C. et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J Am Chem Soc**, v. 93, n. 9, p. 2325-7, May 5 1971.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 12, p. 973-85, Dec 2003.

WIERNIK, P. H. et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. **Cancer Res**, v. 47, n. 9, p. 2486-93, May 1 1987.

WILLSON, T. M.; LAMBERT, M. H.; KLIEWER, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 341-67, 2001.

WILSON, L.; JORDAN, M. A. Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. **Chem Biol**, v. 2, n. 9, p. 569-73, Sep 1995.

WOLF, S. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. **Eur J Cancer**, v. 44, n. 11, p. 1507-15, Jul 2008.

XIAO, W. et al. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type-1 calcium channel subunit. **Neuroscience**, v. 144, n. 2, p. 714-20, Jan 19 2007.


XING, G. et al. Rat PPAR delta contains a CGG triplet repeat and is prominently expressed in the thalamic nuclei. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 217, n. 3, p. 1015-25, Dec 26 1995.

YOUSSEF, J.; BADR, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 1, p. 68-82, Sep 2011.

ZANARDELLI, M. et al. Oxaliplatin neurotoxicity involves peroxisome alterations. PPARgamma agonism as preventive pharmacological approach. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102758, 2014.


ZHU, Y. et al. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 17, p. 7921-5, Aug 15 1995.

9. ANEXO 1 - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA




Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 1º de julho de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “PPAR COMO POTENCIAL ALVO TERAPÊUTICO PARA O TRATAMENTO DA **NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR DROGAS ANTINEOPLÁSICAS**”, UnBDOC n.º 55724/2013, sob responsabilidade da Professora Djane Braz Duarte foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Fernando Pacheco Rodrigues
 Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
 Coordenador da CEUA