



**Universidade de Brasília**

**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Departamento de Farmácia**

ELLEN LUANA DA SILVA OLIVEIRA

ESTUDO DO EXTRATO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Bauhinia*  
*variegata* EM MODELO DE NEUROTOXICIDADE *in vitro*

Brasília

2018

Ellen Luana da Silva Oliveira

ESTUDO DO EXTRATO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Bauhinia*  
*variegata* EM MODELO DE NEUROTOXICIDADE *in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de graduação em Farmácia  
da Universidade de Brasília como parte das  
exigências para obtenção do título de Bacharel  
em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Djane Braz Duarte

Brasília

2018

ESTUDO DO EXTRATO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Bauhinia*  
*variegata* EM MODELO DE NEUROTOXICIDADE *in vitro*

BANCA EXAMINADORA

---

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Djane Braz Duarte

(FS/ Universidade de Brasília)

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ingrid Ferreira Metzger

(FS/Universidade de Brasília)

---

Ms. Carolina Martins Ribeiro

(FARMOL/ Universidade de Brasília)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família, em especial aos meus pais Dulci e Evilásio, que sempre fizeram de tudo para que eu tivesse a melhor educação possível e nunca mediram esforços para me ajudar, me apoiaram nos dias mais difíceis e festejaram minhas vitórias.

Aos meus irmãos Ygor e Lilian, definitivamente, minha vida não seria a mesma sem vocês, obrigada!

À minha avó Heloisa que com tanto carinho cuidou de mim, muito do que me tornei veio da senhora, muito obrigada! À minha avó Antonia, que há tão pouco tempo conheço, mas que me cativou tanto e pela qual tenho tanto carinho!

Gostaria de agradecer à minha orientadora, professora Djane, pela qual tenho enorme admiração e carinho, que me acolheu em seu grupo e com tanto entusiasmo mostrou como a ciência pode ser divertida e que todo resultado é válido, pois os experimentos nunca mentem. Muito obrigada por todas as conversas divertidas, por todos os conselhos, por todos os ensinamentos, por estar sempre presente no dia a dia do laboratório e me guiar tão pacientemente. Obrigada por tudo!

Ao Henrique, que tanto me ajuda no laboratório e fora dele. Obrigada por toda a paciência e o empenho em fazer com que esse trabalho acontecesse. O laboratório não seria o mesmo sem você!

Agradeço às professoras Dra. Ingrid Ferreira Metzger e Ms. Carolina Martins Ribeiro por tão gentilmente aceitarem compor a banca.

Agradeço ao meu amado Irving, que sempre tão pacientemente me ajuda em tudo o que preciso. Obrigada pelo companheirismo, atenção e por sempre acreditar em mim.

Aos meus amigos do Revoltas: Alane, Bárbara, Beatriz, Gabi Freitas, Gabi Souza, Karina, Katarine, Letícia, Louise, Mayara, Palloma, Pedro e Stela. Muito obrigada por todos os momentos de desespero compartilhados, todas as rodas de estudos, todas as risadas, todas as festinhas mais animadas que só a gente sabe fazer. Minha graduação não teria sido a mesma sem vocês!

À equipe da Jornada Acadêmica de Farmácia e a todos os amigos que fiz durante os três anos em que participei da organização. E que me proporcionou enorme crescimento profissional e pessoal.

Gostaria de agradecer às minhas amigas de infância Érika e Gabriela. Que mesmo de longe sempre acreditaram e torceram muito por mim.

Aos outros alunos que conheci através do grupo FarmaDor: Gabriela, Vanessa, Júlia, Henrique, Andressa, Denyse, Gabriel e Jean. Com toda a certeza vocês contribuíram para a construção desse trabalho!

Agradeço aos demais professores, técnicos, estagiários e alunos do Laboratório Farmacologia Molecular (FarMol) por sempre serem tão gentis e acolhedores! Em especial à Simone, Cíntia, Mariella, Ráiza, Marielly e Carol que contribuíram para todos os conhecimentos adquiridos no laboratório. Obrigada!

Por fim, agradeço à Universidade de Brasília (UnB), ao Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol), ao Laboratório de Cirurgia Experimental (CIEX), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e à Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) pelo suporte logístico e financeiro neste projeto.

## RESUMO

O câncer representa um grande desafio aos pesquisadores e profissionais de saúde devido a seu constante aumento do número de casos e de suas complicações. A neuropatia periférica induzida por quimioterápicos (NPIQ) é uma das complicações causadas por alguns dos agentes quimioterápicos mais utilizados para o tratamento de diversos tipos de câncer, como a cisplatina. Com o objetivo de buscar uma alternativa terapêutica para este efeito adverso, o estudo de substâncias com potencial de neuroproteção como o extrato de fungos endofíticos cuja atividade antioxidante já foi demonstrada, é de grande importância. Dessa forma, para investigar a atividade neuroprotetora do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* foi avaliada a expressão gênica de duas isoformas de receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR), PPAR $\gamma$  e PPAR $\beta/\delta$ , conhecidos por exercerem importante ação neuroprotetora em doenças neurodegenerativas. Foram realizadas culturas de células dos gânglios da raiz dorsal (GRD) de ratos, tratadas com o extrato por 48 horas, do 9º ao 11º dia de cultura. O tratamento com a cisplatina teve duração de 24 horas sendo iniciado no 10º dia de cultura e 24 horas após o início do tratamento com o extrato. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados pela técnica de exclusão celular por azul de tripano. Ao término do tratamento, o RNAm foi extraído e sua quantificação foi realizada através da técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase quantitativa (RT-PCRq). Os resultados mostram que o tratamento com o extrato não alterou a viabilidade das células em cultura. A expressão gênica relativa de *Ppar* $\beta/\delta$  em comparação ao controle diminuiu nas concentrações de 1 e 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do extrato de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata*. O tratamento com 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do extrato também reduziu a expressão gênica relativa de *Ppar* $\gamma$ . Tendo em vista que utilizamos a diminuição da expressão dos receptores *Ppar* como marcador da atividade neurotóxica da cisplatina, o extrato não apresentou atividade neuroprotetora. O estudo de novas substâncias capazes de prevenir ou

tratar a NPIQ é de fundamental importância para que o paciente tenha acesso a tratamentos que lhe ofereçam uma melhor qualidade de vida.

**Palavras-chave:** neuropatia periférica induzida por quimioterápicos, receptor ativado por proliferadores peroxissomais, PPAR, neuroproteção, cisplatina, fungos endofíticos, cerrado, *Bauhinia variegata*.

## ABSTRACT

Cancer represents a great challenge to researchers and health care professionals due to the constant rate increase in the number of cases and their complications. Chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN) is one of the complications caused by some of the most commonly used chemotherapeutic agents to treat various types of tumor, such as cisplatin. To find a therapeutic alternative for this adverse effect it is important to study substances with potential for neuroprotection, such as the extract of endophytic fungi of *Bauhinia variegata*, which already showed antioxidant activity. Thus, to evaluate the neuroprotective activity of the endophytic fungi extract of *Bauhinia variegata*, we evaluate the gene expression of two isoforms of peroxisome proliferator activated receptors (PPAR), PPAR $\gamma$  and PPAR $\beta/\delta$ , receptors known to exert an important neuroprotective action in neurodegenerative diseases. Cultures of rat dorsal root ganglion cells (DRG) were performed and treated with the extract for 48 hours, from the 9<sup>th</sup> to the 11<sup>th</sup> day in culture. The cells also were exposed to cisplatin for 24 hours, which started on the 10<sup>th</sup> day in culture and 24 hours after the treatment with the extracts. The cell viability assays were performed by trypan blue cell exclusion technique. At the end of the treatment, mRNA was extracted and quantified using the reverse transcription technique followed by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The results showed that the extract treatment did not alter the viability of the cells in culture. Treatment with 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of the endophytic fungi extract of *Bauhinia variegata* decreased the expression of *Ppar* $\beta/\delta$  relative to the control. Also, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  decreased gene expression of *Ppar* $\gamma$ . Considering that we used the decrease in the expression of *Ppar* receptors as a marker for cisplatin neurotoxic, the extract did not present neuroprotective activity. The study of new substances capable of treating or preventing CIPN is fundamental to help patients to achieve better quality of life.

**Keywords:** chemotherapeutic induced peripheral neuropathy, peroxisome proliferation-activated receptor, PPAR, neuroprotection, cisplatin, endophytic fungi, cerrado, *Bauhinia variegata*

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b>	Locais de ação de quimioterápicos indutores de neuropatia periférica e apresentação dos sintomas.....	19
<b>Figura 2.</b>	Mecanismo de formação de adutos de DNA pela Cisplatina.....	20
<b>Figura 3.</b>	Estrutura da folha da <i>Bauhinia variegata</i> L. ....	25
<b>Figura 4.</b>	Apresentação de fungo endofítico da <i>Bauhinia variegata</i> .....	26
<b>Figura 5.</b>	Estrutura de um receptor nuclear.....	28
<b>Figura 6.</b>	Mecanismos de transativação, transrepressão e repressão de receptores PPAR.....	29
<b>Figura 7</b>	Processo de extração da coluna vertebral.....	34
<b>Figura 8.</b>	Processo de extração de GRDs.....	35
<b>Figura 9.</b>	Esquema de extração, cultivo e coleta de RNA de células do GRD.....	36
<b>Figura 10.</b>	Fotomicrografia de cultura de células do GRD observadas em microscópio óptico.....	40
<b>Figura 11.</b>	Efeito do extrato de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i> na viabilidade celular.....	41
<b>Figura 12.</b>	Curva de amplificação e de dissociação do <i>primer</i> de $\beta$ -actina utilizado como controle interno.....	43
<b>Figura 13.</b>	Curva de amplificação e de dissociação do <i>primer</i> de <i>Ppar<math>\gamma</math></i> .....	44

<b>Figura 14</b>	Efeito do extrato de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i> sobre a expressão gênica relativa de <i>Ppar<math>\gamma</math></i> .....	45
<b>Figura 15.</b>	Curva de amplificação e de dissociação do primer de <i>Ppar<math>\beta/\delta</math></i> .....	47
<b>Figura 16.</b>	Efeito do extrato de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i> sobre a expressão gênica relativa de <i>Ppar<math>\beta/\delta</math></i> .....	48
<b>Tabela 1.</b>	Sequência dos <i>primers</i> utilizados durante o procedimento de PCR quantitativa em tempo real (PCRq-RT).....	39

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ARE** – Elementos da Resposta Antioxidante

**cDNA** – Ácido desoxirribonucleico complementar

**CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**Ct** – Cycle threshold / Ciclo limiar

**CSR** – Centro de Sensoriamento Remoto

**DBD** – Domínio de Ligação ao DNA

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DNase** – Desoxirribonuclease

**DPEC** - Dietilprocarbonato

**EDTA** – Ácido Etilenodiamino tetra-acético

**ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio

**FDA** – Food & Drug Administration

**FDU** – 5-fluoro-2-deoxyuridine

**GL** – Graus Gay-Lussac

**GRD** – Gânglio da Raiz Dorsal

**HDAC** – Histonas Deacetilases

**IBAMA** – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente

**I $\kappa$ B $\alpha$**  – Subtipo  $\alpha$  do Inibidor de  $\kappa$ B

**IL – 1** – Interleucina 1

**IL – 6** – Interleucina 6

**INCA** – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

**Keap1** – Kelch-like ECH-associated protein 1

**LBD** – Domínio de Ligação ao Ligante

**MeOH** – Metanol

**NADH** – Dinucleotídeo de Dicotinamida e Adenina

**N-CoR** – Co-repressor núcleo receptor

**NF- $\kappa$ B** – Fator Nuclear  $\kappa$  B

**NGF** – Nerve Grown Factor

**NP** – Neuropatia Periférica

**NPIQ** – Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterápico

**Nrf2** – Fator nuclear eritroide 2

**PBS** – Tampão Fosfato Salino

**PDL** – Poli-D-Lisina

**PPAR** – Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais

**PPAR- $\alpha$**  – Isoforma  $\alpha$  do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais

**PPAR- $\beta/\delta$**  – Isoforma  $\beta/\delta$  do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais

**PPAR- $\gamma$**  – Isoforma  $\gamma$  do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais

**PFT- $\mu$**  - Pifithrin- $\mu$

**RAM** – Reação Adversa Medicamentosa

**RN** – Receptor Nuclear

**RNA<sub>m</sub>** – Ácido Ribonucleico mensageiro

**RNase** – Ribonuclease

**RNA<sub>t</sub>** – Ácido Ribonucleico total

**RPM** – Rotações por minuto

**RT** – Transcrição Reversa

**RT-PCR<sub>q</sub>** – Transcrição Reversa seguida pela Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa

**RXR** – Receptor do Ácido 9-cis Retinóico

**S1R** – Receptor Sigma 1

**SNC** – Sistema nervoso central

**SNP** – Sistema nervoso periférico

**SOD** – Superóxido dismutase

**SRC-1** – Co-ativador 1 dos Receptores Esteroides

**T<sub>m</sub>** – Melting temperature/Temperatura de dissociação

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

**TRPV1** – Receptor de potencial transitório de anquirina 1

**UV** - Ultravioleta

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Neuropatia periférica induzida por quimioterápicos .....	17
1.2. Cisplatina .....	19
1.3. Neuroproteção.....	22
1.4. Extrato de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i> .....	23
1.5. Receptores ativados por proliferadores peroxissomais.....	27
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo Geral.....	31
3.2. Objetivos Específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Materiais.....	32
4.2. Animais.....	32
4.3. Estabelecimento e manutenção de cultura de células de gânglios da raiz dorsal.....	33
4.4. Extração de fungos endofíticos das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> .....	34
4.5. Tratamento com extrato de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i> e cisplatina.....	36
4.6. Ensaio de viabilidade celular por exclusão celular com azul de tripano.....	37
4.7. Validação dos <i>primers</i> .....	38
4.8. Extração de RNA e quantificação da expressão gênica de <i>Pparβ/δ</i> e <i>Pparγ</i> .....	38

4.9. Análise estatísticas dos dados.....	39
5. RESULTADOS .....	40
5.1. Estabelecimento e manutenção de cultura de células de gânglios da raiz dorsal.....	40
5.2. Avaliação da viabilidade celular em culturas de GRD expostas ao extrato de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i> .....	41
5.3. Avaliação do efeito do extrato de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i> sobre a expressão gênica relativa de <i>Ppar<math>\gamma</math></i> .....	42
5.4. Avaliação do efeito do extrato de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i> sobre a expressão gênica relativa de <i>Ppar<math>\beta/\delta</math></i> .....	46
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO .....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9. ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

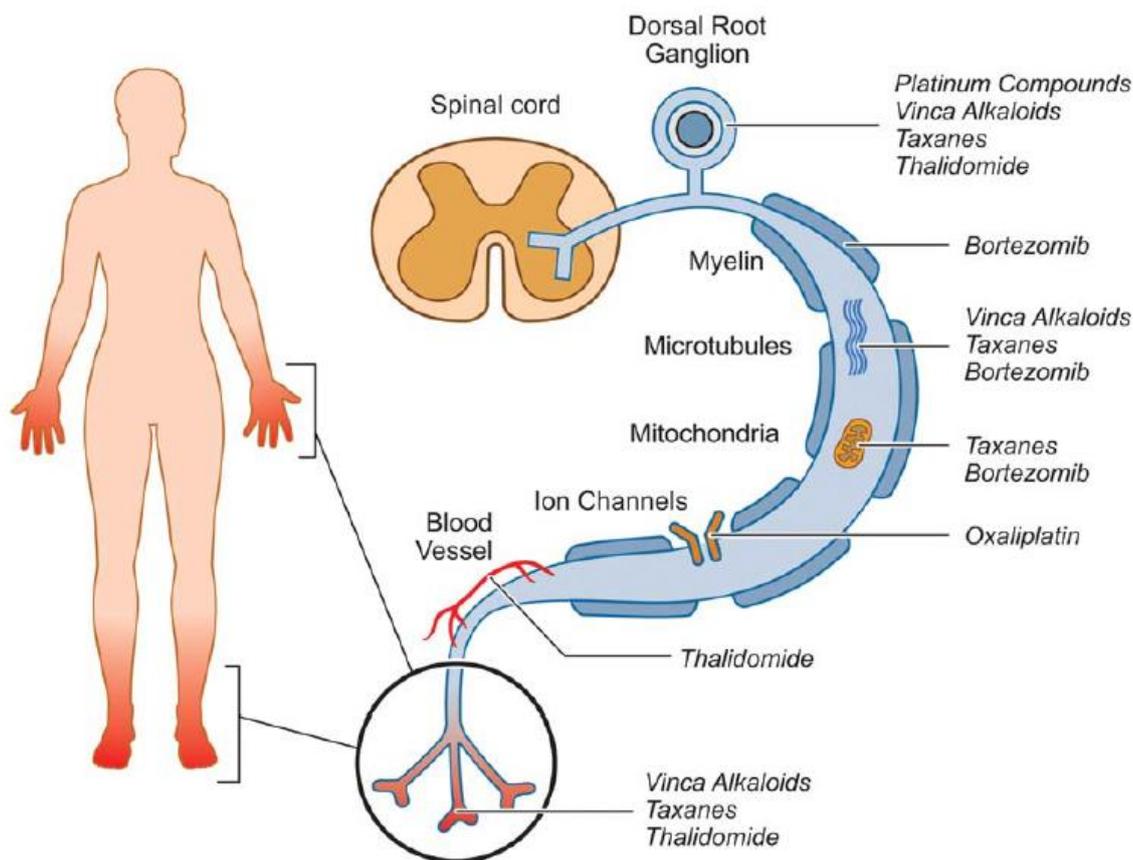
### *1.1 Neuropatia periférica induzida por quimioterápicos*

A incidência de novos casos de neoplasias no mundo tende a aumentar em 70% até 2030 (Rahib, 2014). No Brasil a estimativa de novos casos para o ano de 2018 é de mais de 600 mil casos de câncer entre os gêneros feminino e masculino, dentre as quais as neoplasias prostáticas e mamárias femininas serão responsáveis pela maioria dos casos, seguidas de neoplasias pulmonares (INCA, 2018). O tratamento destas neoplasias engloba procedimentos cirúrgicos, radioterapia e/ou quimioterapia na forma de esquemas medicamentosos únicos ou combinados (INCA, 2012). Nas neoplasias mais prevalentes como as de próstata, mama e pulmão o tratamento inclui medicamentos das classes dos taxanos, dos análogos de platina, dos quimioterápicos antracíclicos, dos anticorpos monoclonais, etoposídeos, dentre outras (Song et al., 2018; Rapoport et al., 2014; Kris et al., 2014). O uso destes fármacos acarreta reações adversas que acabam limitando sua administração em muitos pacientes, como por exemplo alopecia, náuseas, vômitos, diarreia, perda de peso, fadiga, xerostomia, perda de apetite, dor e neuropatia periférica (Pettersson et al., 2013).

A Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterápicos (NPIQ) é uma reação adversa medicamentosa (RAM) que tem como característica ocorrer de forma dose-dependente, embora possa se apresentar a partir de sua primeira administração, como no tratamento com oxaliplatina (Cersosimo, 2005). A neuropatia periférica (NP) apresenta sintomas como ataxia, dor aguda ou crônica, formigamento, parestesia principalmente nas extremidades inferiores e superiores (Wójcik & Matheus, 2011; Fehrenbacher, 2015) e acomete 48% dos pacientes em uso de quimioterápicos (Seretny et al., 2014). Além disso, estudo realizado por Bennet e colaboradores (2012), com 20 pacientes de 2 a 12 meses após o término do

tratamento com oxaliplatina demonstrou a perda da qualidade de vida dos mesmos, que relataram mudanças de hábito e até a necessidade de interrupção do tratamento devido aos sintomas da NPIQ.

Existem algumas hipóteses para explicar os mecanismos pelos quais a NPIQ se manifesta, embora ainda não estejam totalmente elucidadas (Argyriou et al., 2012). Os mecanismos sugeridos diferem de acordo com as classes de drogas utilizadas (**Figura 1**). Os compostos derivados de platina exercem alterações nos núcleos das células neuronais do GRD levando a modificações na maquinaria de transcrição e na vascularização dos GRD (Carozzi et al., 2015). Também existem algumas alterações relacionadas especificamente à oxaliplatina, como a alteração na modulação de canais iônicos axonais, que pode levar ao aumento das correntes de  $\text{Na}^+$ , ocasionando os sintomas de parestesia. Outros quimioterápicos como os alcaloides da vinca e os taxanos também induzem danos em neurofilamentos, alteração no transporte axonal, e danos mitocondriais (Mo et al., 2012). Além disso, o bortezomibe pode causar danos ao retículo endoplasmático de células de Schwann, levando à desmielinização axonal de neurônios (Carozzi, 2015).

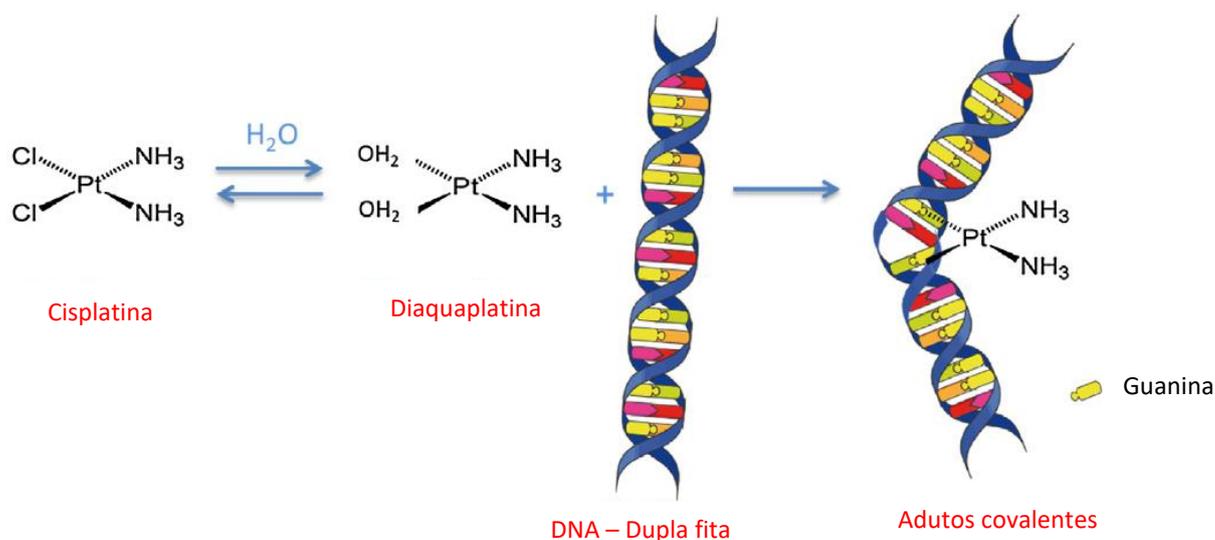


**Figura 1. Locais de ação de quimioterápicos indutores de neuropatia periférica e apresentação dos sintomas.** Fonte: Park et al., 2013.

### ***1.2 Cisplatina***

Dentre os quimioterápicos capazes de induzir a NPIQ está a cisplatina, uma droga que foi sintetizada pela primeira vez em 1844 por M. Peyrone, mas começou a ser estudada somente na década de 1960. Rosenberg observou que a cisplatina inibia a divisão celular de bactérias gram-negativas como a *Escherichia coli* (Dasari & Tchounwou, 2014). Posteriormente o mecanismo de ação antitumoral foi elucidado por Eastman (1987), que identificou a formação de adutos na dupla fita de DNA por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a mesma foi aprovada pelo FDA como agente citotóxico no

mesmo ano (Kelland, 2007). A cisplatina promove a formação de adutos de DNA entre as bases nitrogenadas de guanina, e, por ser um pró-fármaco, necessita de uma reação de hidratação que a torna altamente instável e assim reage com as purinas (**Figura 2**). Esta reação impede que os processos de replicação e transcrição ocorram e ativem mecanismos de reparo e apoptose (Dasari & Tchounwou, 2014).



**Figura 2. Mecanismo de formação de adutos de DNA pela Cisplatina.** Fonte: Rancoule et al. 2016.

Além do mecanismo de formação de adutos de DNA, outras alterações são promovidas a nível celular podendo levar à apoptose, como a liberação de íons de ácido clorídrico, que em pequenas quantidades reagem fortemente com a cisplatina e atuam inibindo a respiração mitocondrial (Aggarwal, 1993). A cisplatina também é capaz de atuar diminuindo as concentrações plasmáticas da enzima glutatona, a partir da diminuição plasmática de dinucleotídeo de dicotinamida e adenina (NADH) causando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Aggarwal, 1998). Com o estresse celular causado pelo

dano ao DNA, as mitocôndrias liberam seu citocromo c, levando à ativação de pró-caspases e outras proteínas pró-apoptóticas, contribuindo para a apoptose celular (Dasari & Tchounwou, 2014). Todos esses danos contribuem para a eficácia da cisplatina em células cancerígenas, porém em células neuronais esses efeitos deletérios podem levar à NP, uma vez que a cisplatina afeta também as células do GRD que não são protegidas pela barreira hematoencefálica (Staff et al., 2017).

Os mecanismos pelos quais a cisplatina causa a NP ainda não estão bem elucidados, embora existam hipóteses de que a cisplatina possa atuar por mecanismos como a inibição do crescimento axonal (Cavaletti et al., 1992). Outras hipóteses são a redução da corrente gerada por canais de cálcio ativados por voltagem em neurônios e o aumento da expressão gênica de Receptor de Potencial Transitório Vaniloide do Tipo 1 (TRPV1), que é responsável pela percepção de temperaturas nocivas (Tomaszewski & Büsselberg, 2007; Ta et al., 2010).

A cisplatina é utilizada em algumas das neoplasias mais prevalentes como no câncer de mama, ovários e pulmão, sendo largamente utilizada como monoterapia ou em esquemas terapêuticos (Dasari & Tchounwou, 2014). Além dos sintomas comumente relatados por pacientes com NP, a cisplatina e outros análogos da platina são capazes de causar um fenômeno conhecido como *coasting*, que consiste na persistência dos sintomas meses após o término do tratamento (Grisold et al., 2012). A cisplatina pode levar a reações adversas em cerca de 50 a 90% dos pacientes de maneira dose-dependente, a partir da dose cumulativa de 300mg/m<sup>2</sup> (Mollman, 1990; LoMonaco et al., 1992). Em 55% dos pacientes com NP induzida por cisplatina os sintomas persistem por mais de 15 anos após o término do tratamento (Strumberg et al., 2002). Atualmente o único medicamento recomendado para o tratamento da NPIQ é a duloxetina, muito embora antidepressivos tricíclicos, gabapentina e amitriptilina também sejam utilizados na prática clínica (Hershman et al., 2014). Assim,

diante da magnitude dos efeitos adversos causados pela cisplatina a busca por terapias neuroprotectoras e tratamentos se faz necessária.

### ***1.3 Neuroproteção***

O tratamento e/ou a prevenção da NPIQ deve ocorrer sem interromper ou minimizar o efeito da quimioterapia (Staff et al., 2017). Para prevenir, tratar e/ou minimizar os efeitos adversos causados pelo uso de quimioterápicos, diversas drogas foram testadas como agentes antioxidantes, co-fatores enzimáticos, quelantes, compostos orgânicos, dentre outros (Albers et al., 2013).

Hershmann e colaboradores (2014), reuniram 42 ensaios clínicos e randomizados que investigavam a eficácia de agentes terapêuticos para a prevenção e/ou tratamento da NPIQ. Dentre os agentes estudados estavam a venlafaxina, tocoferol, ácido retinoico, oxycarbamazepina, ômega 3, nimodipino, glutathione, glutamato, glutamina, carbamazepina, cálcio e magnésio, amitriptilina, amifostina, acetyl-L-carnitine, acetylcysteine, os quais não foram eficientes na prevenção da NPIQ (Hershman et al., 2014).

Em uma revisão de literatura, Schröder e colaboradores (2013) reuniram cerca de 26 estudos que abordaram a utilização de extratos, decocções, ou grânulos de plantas e combinações entre os mesmos para o tratamento da NPIQ. Todos os estudos foram realizados em animais e foram avaliados a alodinia mecânica e dor neuropática. Dentre as plantas utilizadas estavam *Gingko biloba*, *Chamomilla matricaria*, *Salvia officinalis* e *Cannabis sativa fructus* e os autores concluíram que não houveram resultados suficientes para subsidiar a indicação do uso destas plantas no tratamento da NPIQ.

Algumas drogas conhecidas por possuírem atividade neuroprotetora como a pifithrin- $\mu$  (PFT- $\mu$ ), que é capaz de inibir o acúmulo mitocondrial de p53, também foi avaliada em estudos *in vivo* e *in vitro* de NP. Os resultados obtidos demonstraram a diminuição da perda de fibras nervosas nas patas dos animais, sem interferência na ação antitumoral da cisplatina e da oxaliplatina (Krukowski, 2015). Outro trabalho utilizando uma droga antagonista seletiva de receptores sigma 1 (S1R), ainda em fase de estudos clínicos, apresentou resultados favoráveis à redução de sintomas de NPIQ em pacientes com câncer colorretal em tratamento com oxaliplatina (Bruna & Velasco, 2018).

Assim, embora muitas alternativas já tenham sido avaliadas, ainda não há protocolo estabelecido para a prevenção de NIPQ e a utilização de agentes antioxidantes para o combate ao estresse oxidativo gerado pelo uso de quimioterápicos pode ser interessante. Desta forma, o estudo de extratos de produtos naturais com alto teor de moléculas antioxidantes como os flavonoides e que são facilmente encontrados em espécies nativas de biomas brasileiros pode ser uma fonte de agentes neuroprotetores (Carvalho et al., 2017).

#### ***1.4 Extrato de fungos endofíticos da Bauhinia variegata***

O bioma cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, responsável pela ocupação de 21% do território nacional. Um estudo realizado em 2010, pelo Ministério do Meio Ambiente em parceria com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente, revelou que apenas 50,84% da área do cerrado permanece preservada, modificação decorrente da exploração agropecuária das terras e que gera riscos para a preservação deste bioma (CSR/IBAMA, 2010; Klink & Machado., 2005). O cerrado possui 7000 espécies de plantas, dentre as quais 44% são de crescimento exclusivo deste tipo de vegetação (Klink & Machado., 2005). Em

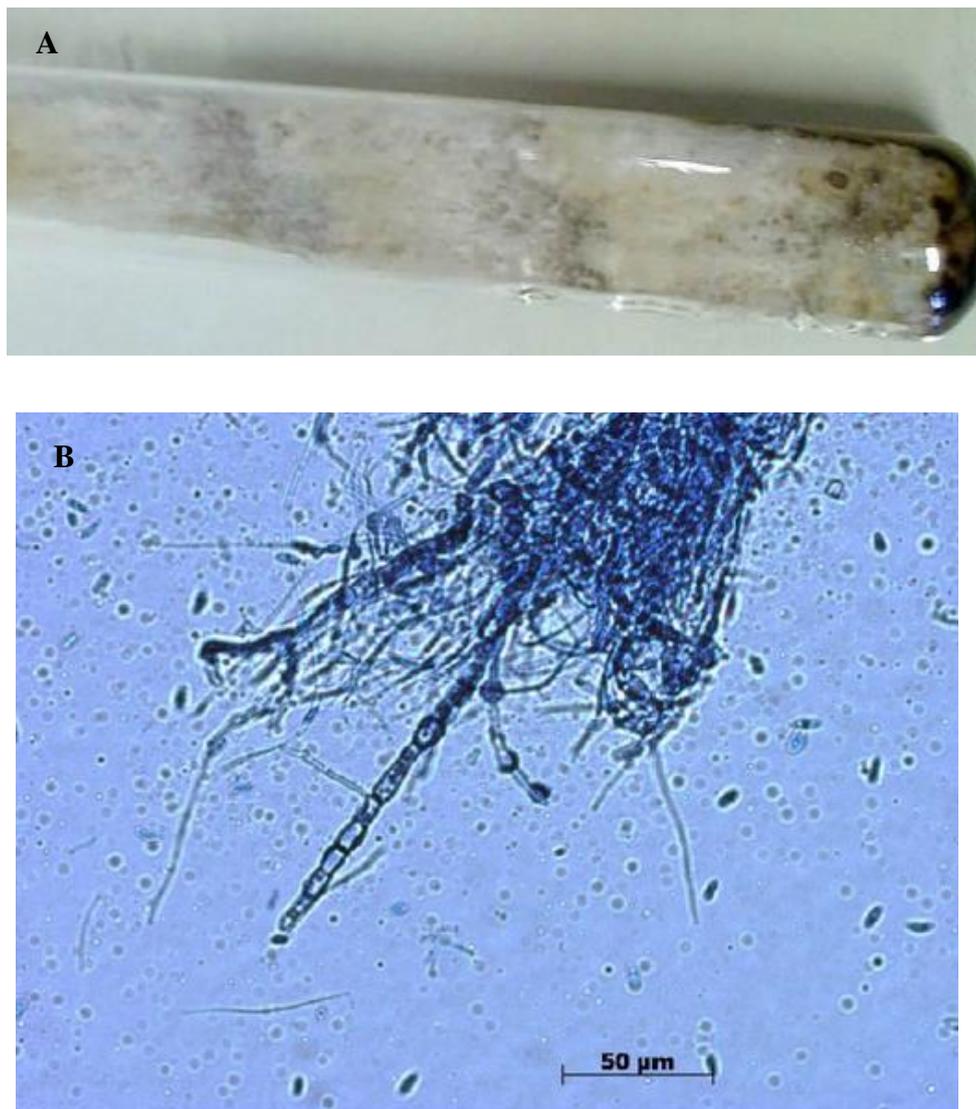
meio a tamanha biodiversidade de flora, cerca de 220 espécies possuem atividades medicinais e dentre estas estão as pertencentes ao gênero *Bauhinia* e à família Fabaceae (Silva et al., 2015).

A *Bauhinia variegata*, conhecida popularmente como pata-de-vaca, é uma espécie originária da região sul do continente Asiático, foi incorporada no Brasil devido aos seus aspectos ornamentais e se desenvolve bem em regiões subtropicais e no bioma do cerrado (Duarte et al., 2007). A *Bauhinia variegata* apresenta modificações quanto sua produção de metabólitos secundários quando cultivada em solo ácido, pobre de nutrientes e assolado por radiação UV, como é característico do cerrado, produzindo flavonoides e taninos que são moléculas de interesse farmacológico (Duarte et al., 2007). Um estudo avaliou o perfil fitoquímico do extrato das folhas da *Bauhinia variegata*, que apresentou atividades antioxidante, antibacteriana e antitumoral, devido a moléculas como os flavonoides, terpenos e alcaloides que apresentam atividade antioxidante (Mishra et al., 2013). A morfologia de suas folhas é semelhante à morfologia de outras espécies de seu mesmo gênero, apresentando dois lobos e diferindo em seu ápice arredondado, como pode ser observado na **Figura 3** (Duarte et al., 2007).



**Figura 3. Estrutura da folha da *Bauhinia variegata* L.** – A) Representação cartográfica da folha. B) Folha da *Bauhinia variegata*, espécie encontrada no cerrado. Adaptado de: Duarte et al, 2007; Mesquita, 2012.

Os fungos endofíticos vivem em simbiose com as células das folhas de diversas plantas, onde atuam produzindo metabólitos secundários em resposta à interação com o hospedeiro. A princípio, esses fungos não apresentam danos ao hospedeiro e conferem proteção extra contra o estresse oxidativo causado pelo processo fotossintético, por exemplo (Mesquita, 2015; Azevedo et al., 2000). Os fungos endofíticos podem passar de geração para geração em determinadas espécies de plantas (Caroll, 1988). O fungo *Phomopsis* sp., proveniente das folhas da *Bauhinia variegata*, é conhecido pela enorme gama de metabólitos que é capaz de produzir, podendo causar citotoxicidade ou atuar como antioxidante frente a ERO (Mesquita, 2015). Quando extraído das folhas da *Bauhinia variegata* e cultivado em laboratório, apresenta-se na forma de hifas espessas, septadas e com presença de esporos com coloração marrom claro (**Figura 4**).



**Figura 4. Apresentação de fungo endofítico da *Bauhinia variegata*.** A) Fungo visto a olho nu, isolado em meio Sabouraud-dextrose. B) Registrado através de microscópio óptico corado com azul de algodão (aumento de 200X). Adaptado de: Mesquita, 2012.

Os fungos endofíticos da família *Phomopsis sp.* possuem atividade biológica que vão desde ação antitumoral, antimicrobiana e antimalárica (Rukachaisirikul, 2007), até atividade antioxidante e de agonista de receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) (Mesquita, 2015). Visto que uma das formas de ação citotóxica causada pela cisplatina é o acúmulo de radicais livres nos corpos celulares do GRD, além de ativar diversas vias

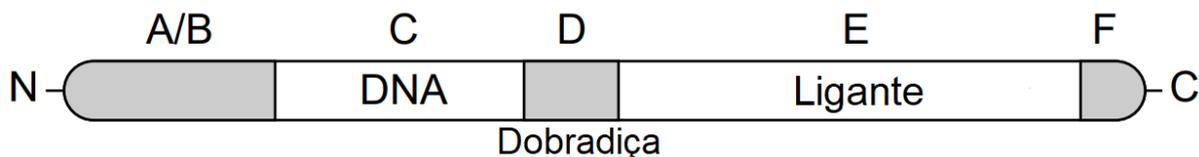
inflamatórias, a utilização de um extrato com atividade antioxidante e ativadora de PPAR poderia ser um potencial neuroprotetor neste modelo de neurotoxicidade.

### ***1.5 Receptores nucleares ativados por proliferadores peroxissomais***

A produção de ERO é um dos mecanismos pelos quais a cisplatina atua, assim como a formação de adutos de DNA (Dasari & Tchounwou, 2014). As EROs ativam mecanismos de defesa celulares e dentre eles estimulam o fator nuclear  $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B), que por sua vez estimula a transcrição de genes responsáveis pela produção de citocinas (Cavaletti et al., 2011). Todos esses fatores contribuem para uma hipersensibilização do neurônio e ativação de mecanismos anti-inflamatórios, como a modulação da expressão de genes mediados pelos receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) (Kapadia et al., 2009). Os receptores PPARs pertencem à família dos receptores nucleares e podem ser divididos em três isoformas PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  (Lima, 2011). Estes receptores são uma classe de fatores de transcrição regulados por ligantes e que são ativados a partir da ligação de hormônios esteroides e outras substâncias lipossolúveis (Mangelsdorf et al. 1995).

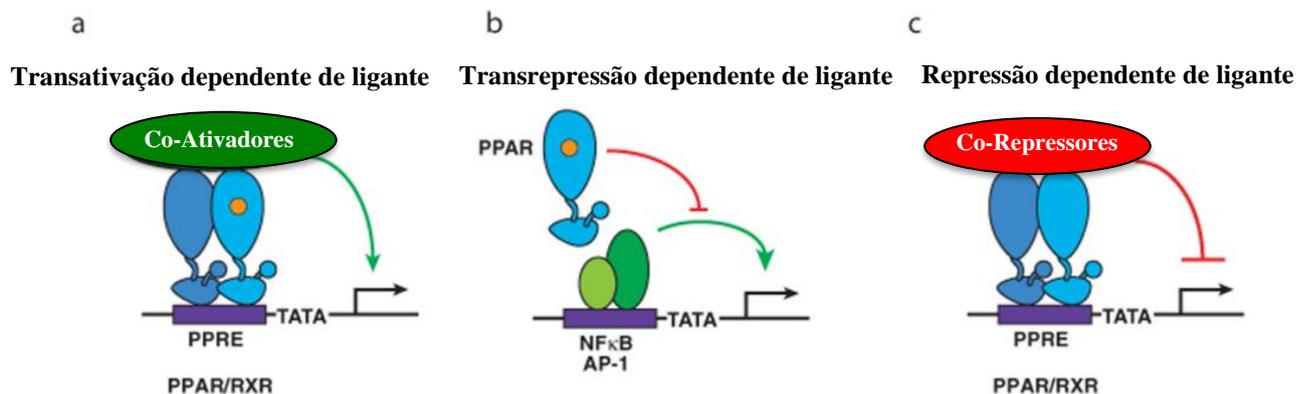
Os receptores PPAR, assim como os demais receptores nucleares, têm sua estrutura formada por um domínio A/B, N-terminal, cuja fosforilação implica diretamente na modulação das isoformas  $\alpha$  e  $\gamma$ . Este sítio está localizado próximo ao sítio de ligação ao DNA, C, (do inglês: DBD – *DNA binding domain*) composto por dois dedos de zinco altamente conservados, estruturas responsáveis pelo reconhecimento do elemento responsivo específico de cada receptor e pela dimerização dos receptores; ao lado do DBD está uma região de dobradiça altamente variável (D); a seguir está o domínio de ligação ao ligante (LBD – *ligand binding domain*) localizado na porção C-terminal, que é responsável

pela especificidade da resposta fisiológica e, por fim, contam com uma região C-terminal variável (**Figura 5**) (Laudet et al., 1992; Mangelsdorf et al., 1995; Rastinejad, 2001; Barra et al., 2004; Tavares et al., 2007).



**Figura 5. Estrutura de um receptor nuclear.** Adaptado de: Rastinejad, 2001.

Os receptores PPAR formam heterodímeros com os receptores do ácido 9-cis-retinoico (RXR) o que leva a uma mudança conformacional no domínio C-terminal iniciando o recrutamento de co-ativadores, como o co-ativador 1 dos receptores esteroides (SRC-1). Este recrutamento induz alterações na cromatina resultando em transativação e, conseqüente, aumento da expressão de genes regulados por estes receptores (DiRenzo et al., 1997). A heterodimerização também promove o recrutamento de co-repressores, como co-repressor núcleo receptor (N-CoR), que pode se associar a histonas deacetilases (HDACs), atuando como repressor no promotor ao qual o receptor está ligado e inibindo a transcrição dos genes (DiRenzo et al., 1997; Xu et al., 1999). O PPAR também age por meio da transrepressão, antagonizando a ação de outros fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B. A transativação e a transrepressão de genes são processos dependentes de ligantes, entretanto a repressão é um processo que ocorre independentemente da presença de ligantes (**Figura 6**) (Ricote & Glass, 2007).



**Figura 6. Mecanismos de transativação, transrepressão e repressão de receptores PPAR.** A) Mecanismo de transativação dependente de ligante; B) Mecanismo de transrepressão dependente de ligante; C) Mecanismo de repressão dependente de ligante. Adaptado de: Ricote & Glass, 2007.

Dentre as três isoformas desses receptores, o PPAR $\alpha$  foi a primeira isoforma a ser descoberta e está presente em órgãos como fígado, músculos esqueléticos, coração e ossos; o PPAR $\beta/\delta$  é expresso em todos os tecidos e possui a função de regular o gasto energético de todo o organismo, além de agir como supressor de inflamação; o PPAR $\gamma$  é expresso em células endoteliais e em células do músculo liso vascular e é capaz de reduzir a resistência à insulina por atuar de forma contrária ao TNF- $\alpha$ , mediador pró-inflamatório (Tyagi et al., 2011). Em estudos anteriores foi demonstrado que a ativação da isoforma PPAR $\gamma$  leva a uma indução da enzima superóxido dismutase Cu/Zn (Cu/Zn-SOD), responsável pela catálise das reações de neutralização das ERO, consequentemente, interferindo na resposta inflamatória (Hwang et al., 2005). Além disso, existem estudos mostrando que a ativação destes receptores tem papel neuroprotetor em modelos de neurodegeneração (Falcone, 2015), o que nos levou a hipotetizar que o aumento da expressão gênica de PPAR poderia proteger contra o dano causado pela cisplatina.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A neuropatia periférica induzida por drogas quimioterápicas é um dos principais fatores que dificulta a adesão à terapia farmacológica e, ainda, compromete severamente a qualidade de vida dos pacientes. Estudos epidemiológicos recentes mostraram que pacientes com dor neuropática decorrente da quimioterapia não recebem tratamento adequado, quer seja por dificuldade no diagnóstico ou por limitação da terapia analgésica disponível atualmente. Destarte, torna-se necessário a elucidação dos possíveis eventos moleculares envolvidos na neurotoxicidade induzida por agentes quimioterápicos, o que contribuiria para um melhor entendimento do processo de estabelecimento da NP, assim como no desenvolvimento de novos agentes neuroprotetores.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade neuroprotetora do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* em cultura de células do GRD tratada com cisplatina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1) Avaliar a viabilidade de cultura de células do GRD tratadas com extrato de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata*.
- 2) Avaliar a expressão de gene de *Ppar $\gamma$*  em cultura de células do GRD tratadas com extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata*.
- 3) Avaliar a expressão de gene de *Ppar $\beta/\delta$*  em cultura de células do GRD tratadas com extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 *Materiais*

Foram utilizados durante os experimentos deste trabalho os seguintes 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, azul de tripano, estreptomicina e cisplatina foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canadá). O meio de cultura F12, fungizona, o soro de cavalo inativado por calor e a L-glutamina foram adquiridos da Gibco<sup>®</sup>, Life technologies (Carlsbad, CA, EUA). O TRIzol foi adquirido da empresa Ambion<sup>®</sup> RNA, Life Technologies (Austin, TX, EUA), a albumina sérica bovina (BSA) da empresa Biolabs (Beverly, MA, 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).

### 4.2 *Animais*

Foram utilizados ratos, machos e fêmeas, da espécie *Rattus norvegicus* pertencentes à linhagem Wistar, com peso entre 200 e 300 gramas. Os animais receberam água e comida *ad libitum* e permaneceram em ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais da Universidade de Brasília (protocolo de autorização UnBDoC n.º 51793/2014, **Anexo 1**).

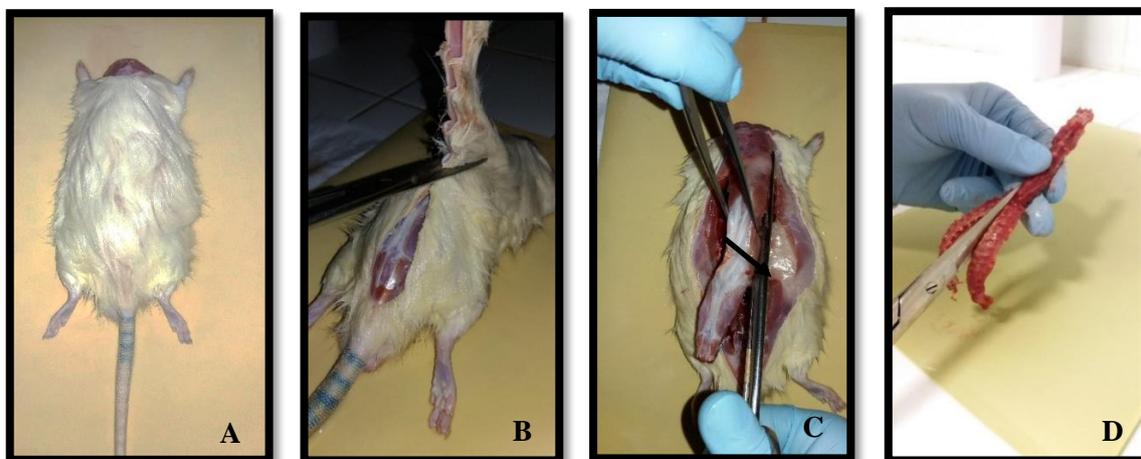
### ***4.3 Extração de fungos endofíticos das folhas de Bauhinia variegata***

Os extratos dos fungos utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Maria de Fátima Borin, do Laboratório de Farmacologia Molecular. Os fungos foram obtidos de folhas de *Bauhinia variegata L.* no período matutino no Campus Universitário Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília – DF. Após sua coleta as folhas foram lavadas em água corrente e com detergente líquido e passaram por imersão em etanol 70°GL por 60 segundos. Em seguida as folhas foram imersas em recipientes diferentes contendo hipoclorito de sódio (cloro ativo a 2%) por três períodos diferentes (60, 90 e 180 segundos), novamente imersas em etanol 70° GL por 60 segundos e em seguida lavadas por imersão sob agitação por 3 segundos com água esterilizada. Após estes processos o excesso de água foi removido com auxílio de um papel filtro esterilizado. As folhas foram cortadas com o auxílio de uma tesoura e depositadas sobre uma placa de petri contendo 20 mL de meio ágar Sabouraud-dextrose e incubadas de 3 a 5 dias. As colônias resultantes foram repicadas e isoladas em meio sólido de ágar batata dextrose e incubadas por 7 dias a 30° C. Durante este período houve formação de micélios e conídios, que foram recolhidos através da adição de 9 mL de água esterilizada à cultura e raspagem da mesmo com auxílio de uma espátula, formando uma suspensão adicionada a 50 mL de meio pré-fermentativo, mantido a 30° C, sob agitação constante a 150 RPM, por 48 horas. Todo o conteúdo gerado foi inoculado em um segundo frasco contendo 1000 mL de meio fermentativo e mantido nas mesmas condições por 72 horas. Os micélios das culturas fermentativas foram separados por fluidos de cultura por filtração a vácuo seguida de extração por partição líquido-líquido utilizando acetato de etila. A fração orgânica contendo o acetato de etila foi recuperada e

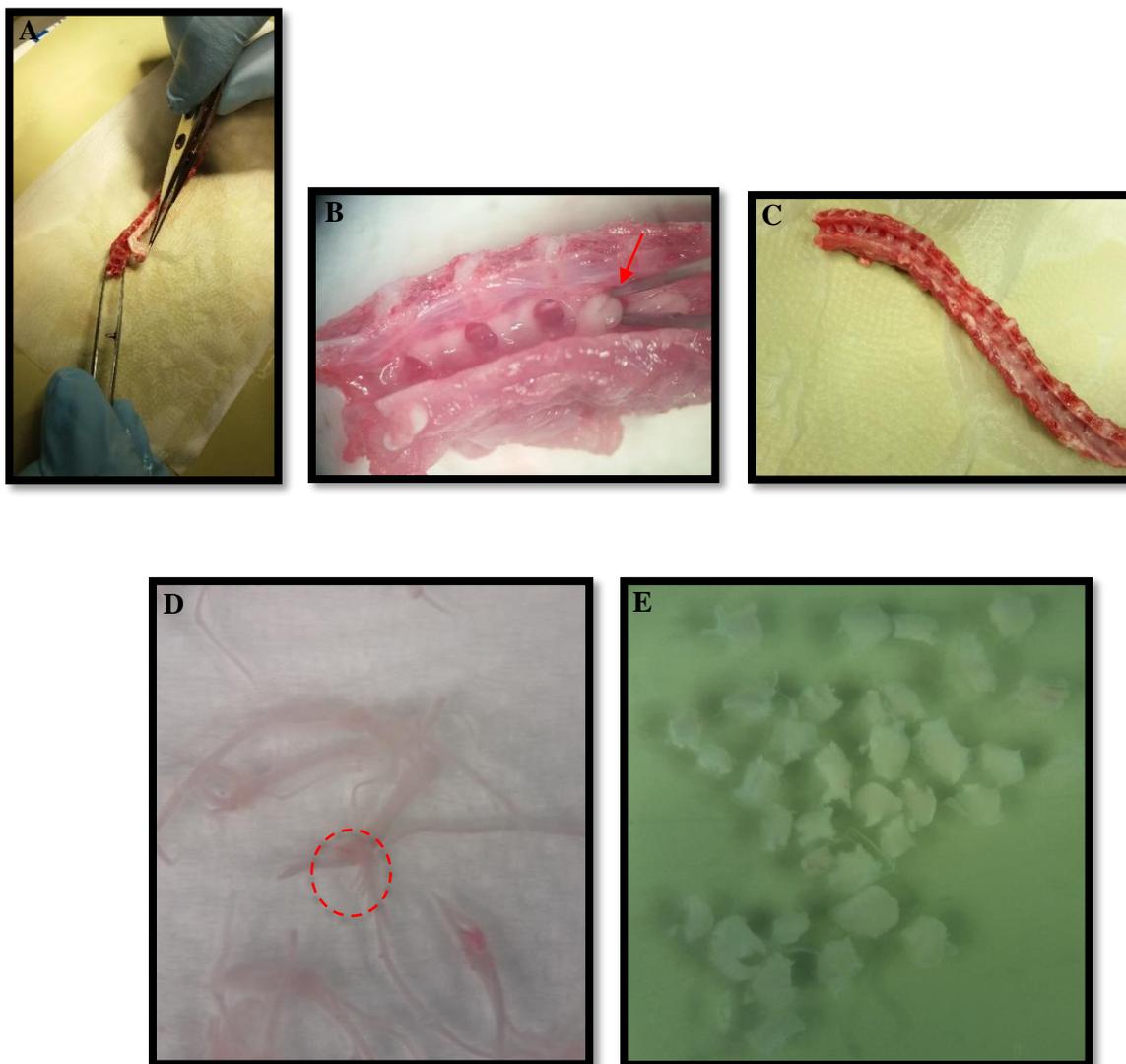
concentrada com o auxílio de um evaporador rotativo à vácuo. Ao término da secagem os extratos foram pesados e armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### ***4.4 Estabelecimento e manutenção de cultura de células de gânglios da raiz dorsal***

Os animais foram eutanasiados em câmara de  $\text{CO}_2$  e posteriormente decapitados com o auxílio de guilhotina. O procedimento de extração dos GRDs foi realizado de acordo com protocolo descrito por Burkey et al. (2004) e representado nas **Figuras 7 e 8**. A coluna espinhal foi extraída e seccionada, expondo-se os GRDs. Os gânglios foram extraídos e tiveram suas raízes retiradas, para facilitar o processo de digestão enzimática e então foram incubados por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  em colagenase a 0,125%.



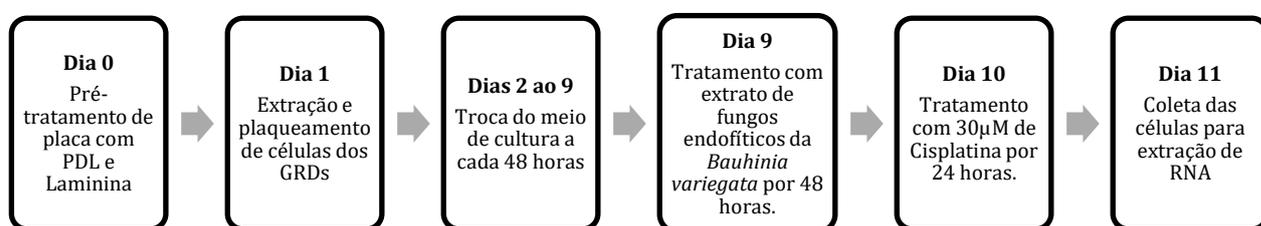
**Figura 7. – Extração da coluna vertebral** - A) Animal após decaptação e exsanguinação. B) Remoção da pelagem e da pele do animal. C) Extração da coluna vertebral do animal. D) Secção da coluna vertebral do animal realizada a partir dos processos espinhosos visando manter sua simetria longitudinal.



**Figura 8. Processo de Extração de GRDs** A) Remoção da medula espinhal, indicada pela seta preta. B) Visão dos GRD na coluna vertebral (seta vermelha) e sua extração. C) Visão da coluna vertebral após extração dos GRD. D e E) GRDs antes (pontilhado vermelho) e depois da remoção de suas raízes, respectivamente.

Após sua extração, os GRD foram incubados por 1 hora a 37° C em colagenase a 0,125% (Burkey et al., 2004). Ao término do período de incubação, os gânglios extraídos foram processados mecanicamente com pipeta Pasteur e as células foram plaqueadas em placas de 12 poços, pré-tratadas com 100 µg/mL de Poli-D-Lisina (PDL) e 5µg/mL de

Laminina, respectivamente. A manutenção da cultura foi realizada pela troca do meio de cultura 24 horas após o plaqueamento e, subsequentemente, a cada 48 horas por onze dias (**Figura 8**). O meio de cultura utilizado foi o F12, contendo 50  $\mu\text{M}$  de 5-flúor-2-desoxiuridina e 150  $\mu\text{M}$  de uridina, 10% de soro de cavalo inativado por calor, 2 mM de L-glutamina, 50  $\mu\text{M}/\text{mL}$  de penicilina e estreptomicina, 250 ng/mL de fator de crescimento do nervo (*Nerve Grown Factor* – NGF) e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de normocina.



**Figura 9.** Esquema de extração, cultivo, tratamento e coleta de RNA de células do GRD.

#### ***4.5 Tratamento com extrato de fungos endofíticos da Bauhinia variegata e cisplatina***

Foram estabelecidas as concentrações de 1, 3 e 9  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de extrato, baseadas em estudos anteriores que relataram que 3,36  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ativa as três isoformas de PPAR em células mesangiais e adipócitos (Mesquita, 2015). A concentração de cisplatina utilizada de 30  $\mu\text{M}$  foi padronizada por Jiang e colaboradores (2008) e não alterou a viabilidade das células do GRD. Os extratos foram inicialmente diluídos em metanol (MeOH) e a concentração final no meio de cultura foi de 0,1% de MeOH. As células foram expostas ao extrato por 48 horas

e ao tratamento com cisplatina (30  $\mu$ M) por 24 horas. O tratamento com o extrato foi iniciado anteriormente para que a potencial atividade neuroprotetora pudesse ser avaliada.

#### ***4.6 Ensaio de viabilidade celular por exclusão celular com azul de tripano***

No nono dia em cultura as células foram expostas a diferentes concentrações de extratos por 48 horas. Em seguida o meio de cultura foi coletado, os poços foram lavados com tampão fosfato salino 1x (*Phosphate Buffered Saline* – PBS 1x) e as soluções resultantes foram coletadas, para que o máximo de células fossem recolhidas e contabilizadas. As células foram então incubadas com 500  $\mu$ L/poço de tripsina 0,5% por 2 minutos a 37° C, seguida de inativação da tripsina com 500  $\mu$ L de meio de cultura. Após dissociação mecânica, o meio foi coletado novamente, seguida de duas lavagens com PBS 1x e coleta. Após este processo os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos a 25° C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em PBS 1x. Para a contagem das células foram feitas alíquotas de cada amostra com azul de tripano 0,4% na proporção de 1:1. A solução resultante foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e a contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer. O reagente azul de tripano atua nas células ao adentrar membranas comprometidas, corando as células inviáveis de azul, enquanto as células viáveis apresentam coloração amarelada. A contagem foi realizada por experimentador cego sobre as condições de tratamento. A quantificação das células viáveis e inviáveis seguiu as recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich®).

#### **4.7 Validação dos primers**

Os *primers* utilizados foram validados anteriormente em trabalho de nosso grupo (dados ainda não publicados) e para tal foi criada uma curva de eficiência relativa com diferentes concentrações conhecidas de RNA extraído de culturas de células de GRDs. Os *primers* se mostraram específicos para seus respectivos genes ao apresentarem apenas um pico na curva de dissociação (Curva de *melting*). A eficiência dos pares de *primers* se mantiveram dentro do valor esperado entre 90% e 110%. (Oliveira, 2017). O *primer* de *Ppar $\gamma$*  já havia sido validado por outro grupo do Laboratório de Farmacologia Molecular (Milton, 2015).

#### **4.8 Extração de RNA e quantificação da expressão gênica de *Ppar $\beta/\delta$* e *Ppar $\gamma$***

Após 24 horas de tratamento com cisplatina as amostras foram coletadas em TRIzol, e dele o RNA total foi extraído, seguindo diversas etapas, conforme as recomendações do fabricante. Após a extração do RNA as amostras foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoVue e tratadas com a enzima DNase. Por fim, as amostras tratadas com DNase foram diluídas e utilizadas para avaliação da expressão de *Ppar $\beta/\delta$* , *Ppar $\gamma$*  e  $\beta$ -actina (controle interno), realizadas através da técnica de RT-PCR-q. O experimento foi realizado em triplicata para cada uma das amostras, utilizando o kit enzimático Power SYBR® Green RNA-to- $C_T$ <sup>TM</sup> 1-Step Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e as concentrações de *primers* e enzimas do mix foram calculadas de acordo com as recomendações do fabricante. As sequências dos *primers* utilizados estão na tabela 1.

**Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados durante o procedimento de PCR quantitativa em tempo real (PCRq-RT)**

<i>Primer</i>	<b>Sequência</b>
$\beta$ -actina	F: 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' R: 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'
<i>Ppar</i> $\beta/\delta$	F: 5'-CACATCTACAATGCCTACCT-3' R: 5'-CTTCTCTGCCTGCCACAATGTCT-3'.
<i>Ppar</i> $\gamma$	F: 5'-TTTTCCGAAGAACCATCCGAT-3' R: 5'-ATGGCATTGTGAGACATCCCC-3'

Fonte: Zhang et al., 2015; FA,2015; Oliveira, 2017.

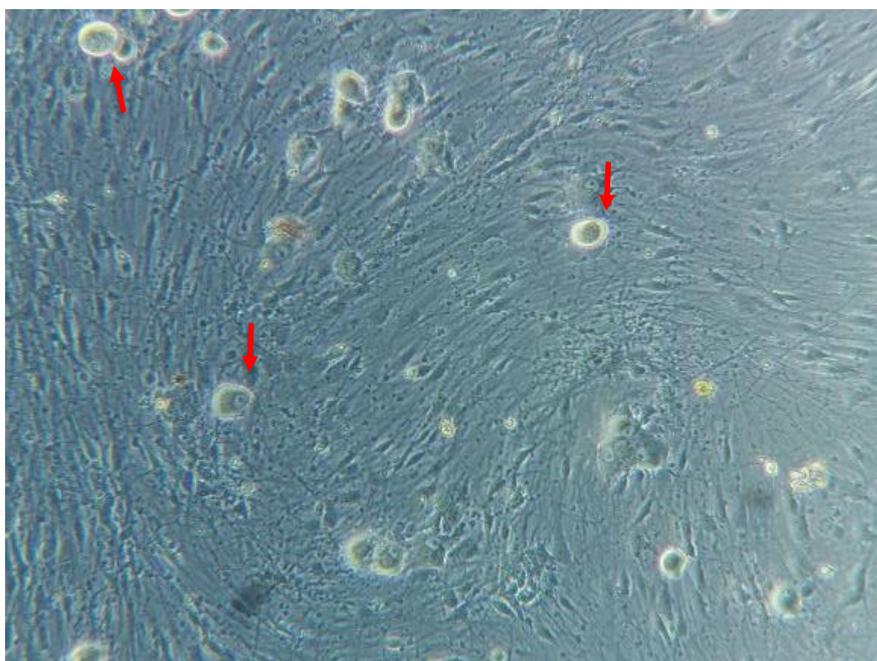
#### ***4.9 Análise estatísticas dos dados***

A análise dos dados foi realizada através do Software GraphPad Prism® (GraphPad Software para Windows, San Diego, CA). A distribuição dos resultados dos ensaios foi considerada não-paramétrica e os resultados foram representados pela média e erro padrão da média (*standard error of the mean* - SEM). O teste aplicado foi o de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunns. Foram considerados estatisticamente significantes todos os resultados cujo valor de  $p < 0,05$ . Cada “n” experimental é representado por um experimento diferente, cujo estabelecimento da cultura e plaqueamento foram realizados em procedimentos independentes.

## 5. RESULTADOS

### *5.1 Estabelecimento e manutenção de cultura de células de gânglios da raiz dorsal*

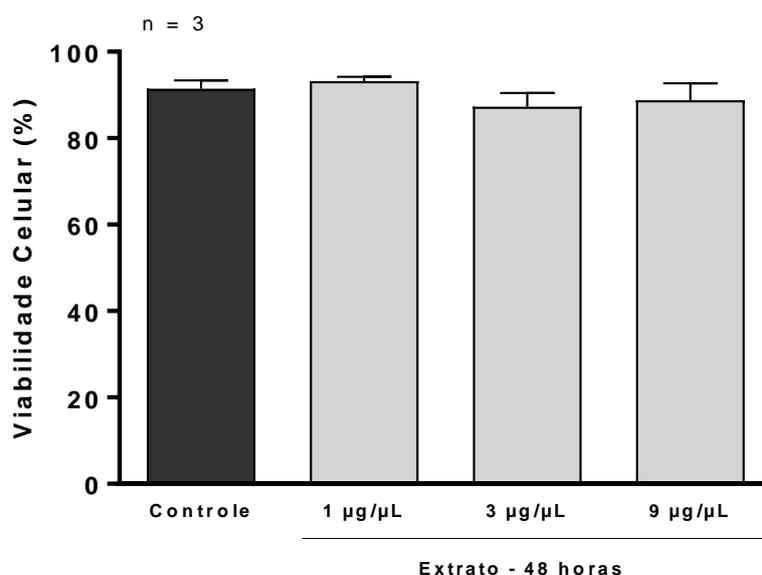
A cultura de células de GRD é uma cultura mista com neurônios (células refringentes – setas vermelhas) e células não neuronais (glia e fibroblastos) que apresentam um crescimento sinusoidal (**Figura 10**). As culturas foram consideradas viáveis quando as células permaneciam aderidas até o dia 11 em cultura, as células não neuronais apresentavam crescimento em formato sinuoso na placa e os neurônios expandiam neuritos, que são projeções celulares com tamanho maior que o corpo da célula.



**Figura 10 – Fotomicrografia de cultura de células do GRD observadas em microscópio óptico.** As setas vermelhas indicam os corpos celulares de neurônios periféricos (aumento de 200x). Foto feita pelo autor no dia 9 em cultura.

## 5.2 Avaliação da viabilidade celular de células em cultura expostas ao extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata*

Para avaliar a viabilidade das células de GRD expostas a diferentes concentrações do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* foi realizado o teste de viabilidade celular por azul de tripano. As células foram tratadas com o extrato e o controle (0.1% de metanol) por 48 horas. Nenhuma das diferentes concentrações dos extratos alterou a viabilidade celular quando comparadas com o controle (**Figura 11**).



**Figura 11.** Efeito do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* na viabilidade celular.

As culturas primárias de GRDs foram tratadas com 1, 3 e 9 µg/µL de extrato por 48 horas no 9º dia de cultura. Em seguida a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão celular com azul de tripano. Os dados foram expressos como média ± SEM e analisados estatisticamente pelo método de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ );  $n = 3$

### ***5.3 Avaliação do efeito do extrato de fungos endofíticos da Bauhinia variegata sobre a expressão gênica relativa de Ppar $\gamma$***

Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que o tratamento com cisplatina na concentração de 30  $\mu$ M reduz a expressão de RNAm para *Ppar $\gamma$*  em culturas de células de GRDs (Oliveira, 2017).

Assim, para avaliar se o tratamento com extratos de fungos endofíticos modula esta redução na expressão gênica de *Ppar $\gamma$*  foi realizado o método de RT-PCR-q. Como a beta actina foi utilizada como controle interno em todos os experimentos de expressão gênica, apresentamos uma figura representativa da curva de amplificação e da curva de dissociação das cópias de RNA de beta actina e um experimento. Os resultados mostram que o par de *primer* não formou dímeros, devido ao único pico presente na curva de dissociação, e que a expressão de beta-actina apresentou número de ciclos de amplificação (cT) semelhante ao de outras amostras analisadas em nosso laboratório, início de amplificação a partir do 16º ciclo (**Figura 12**). Da mesma forma, a **Figura 13** representa a curva de amplificação e a curva de dissociação das cópias de RNA de *Ppar $\gamma$* , indicando que o par de *primers* não formou dímeros, devido à presença de um pico único na curva de dissociação.

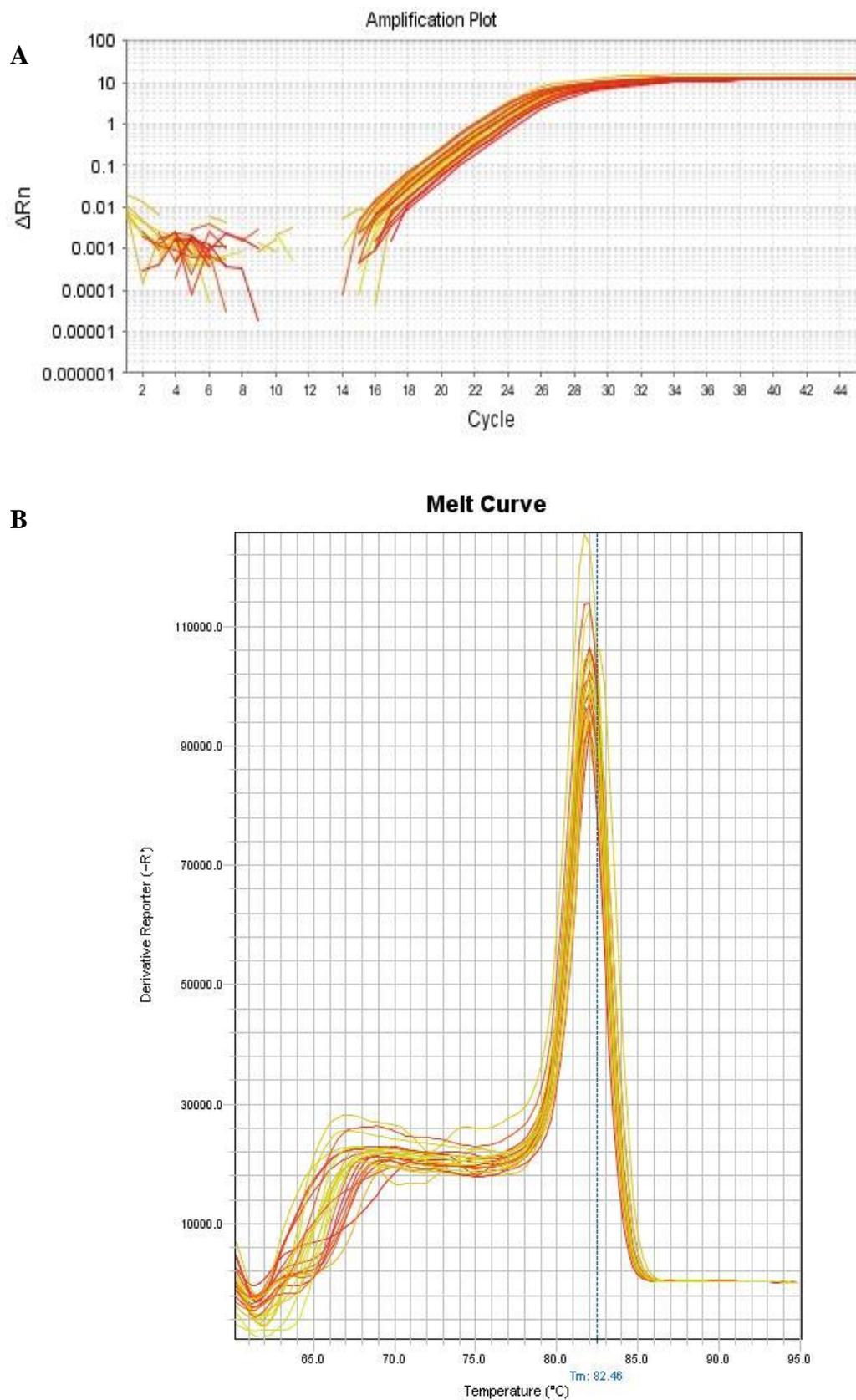
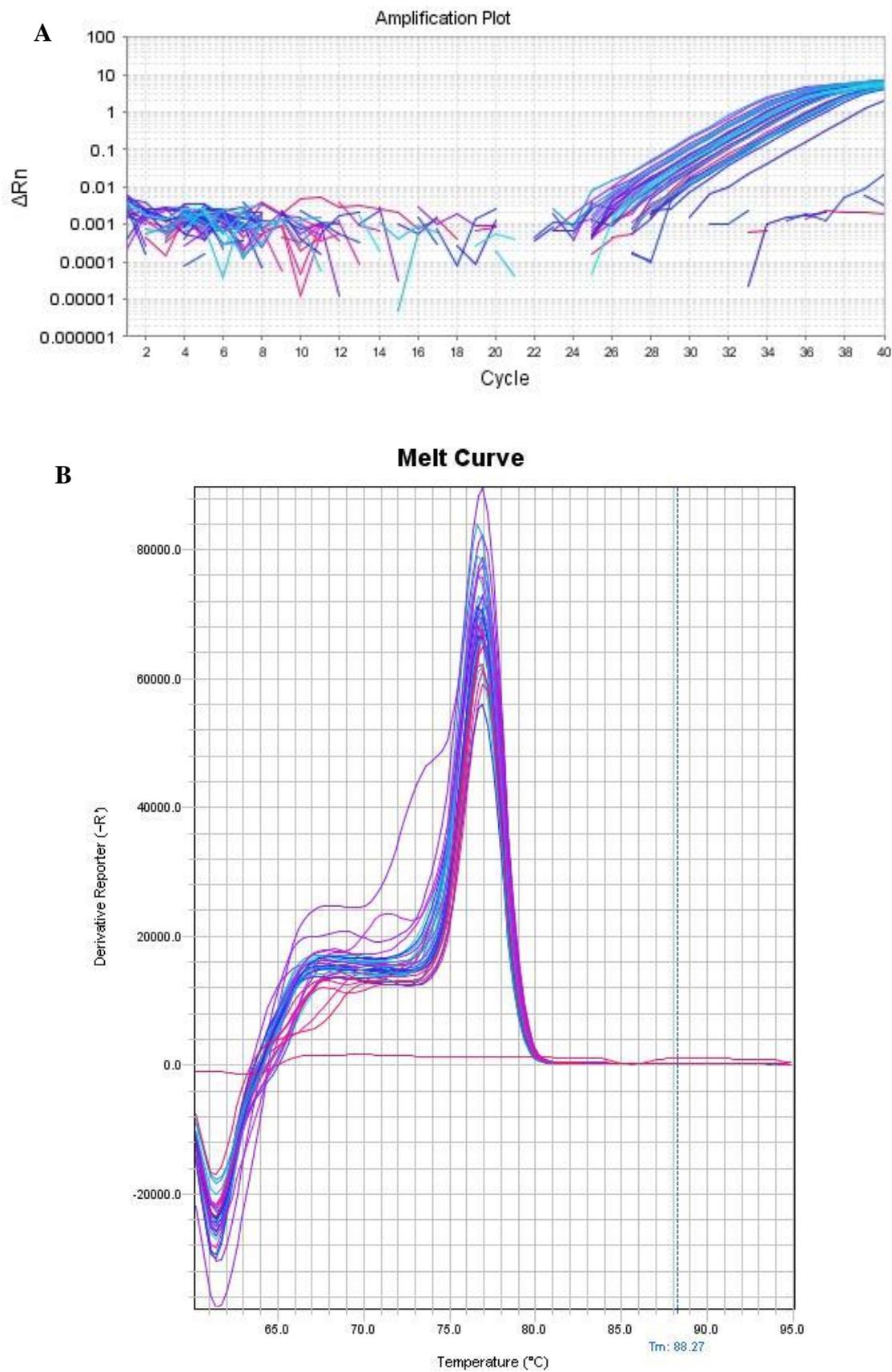
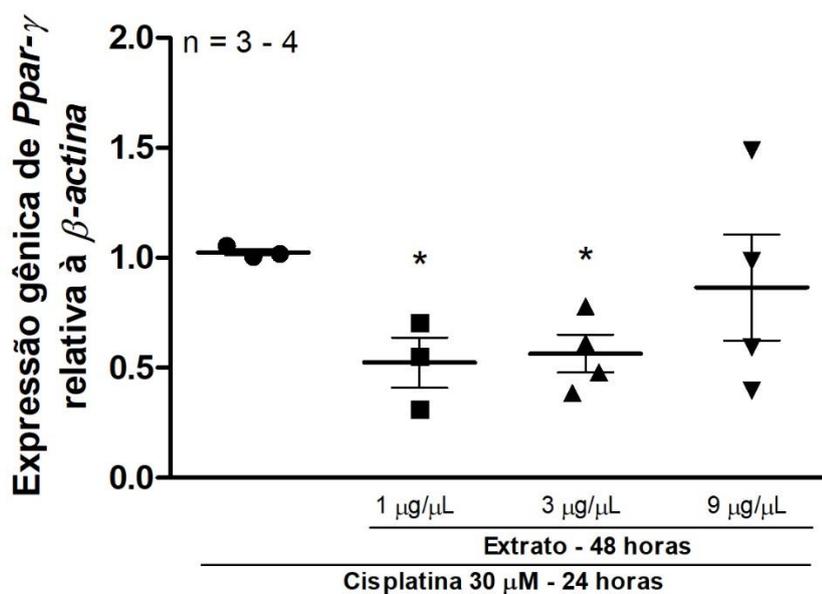


Figura 12. Curva de amplificação e de dissociação do *primer* de  $\beta$ -actina utilizado como controle interno. A) Curva de amplificação e B) Curva de dissociação (Curva de *Melting*)



**Figura 13.** Curva de amplificação e de dissociação do *primer* de *Ppar $\gamma$* . A) Curva de amplificação e B) Curva de dissociação (*Melting Curve*).

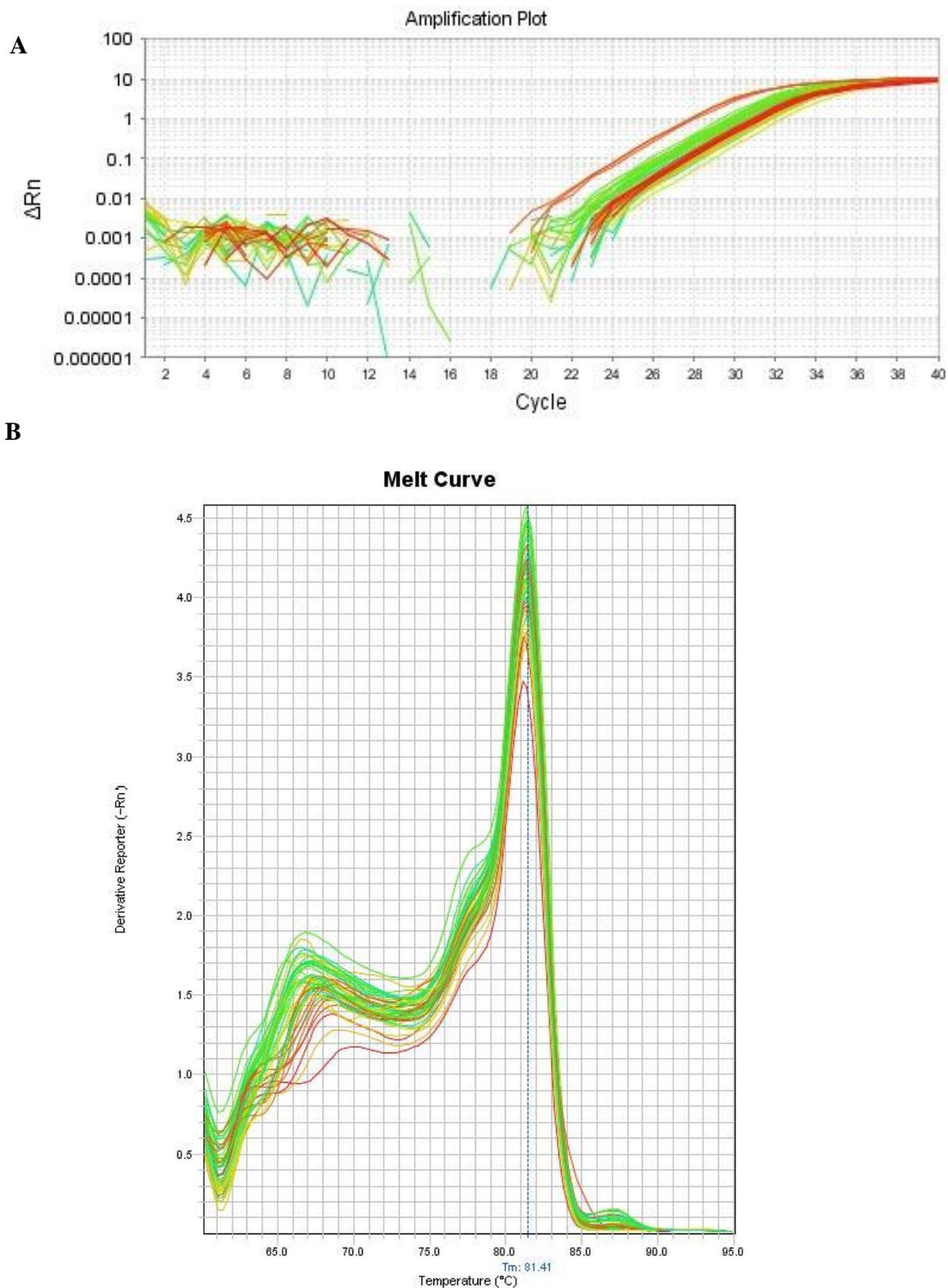
Para a análise da expressão gênica de *Ppar $\gamma$*  consideramos o controle de cisplatina igual a 1. Os tratamentos com 1 e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do extrato reduziram a expressão de RNAm de *Ppar $\gamma$* , enquanto o extrato na concentração de 9  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  não alterou a expressão gênica desse transcrito quando comparado ao tratamento com cisplatina (**Figura 14**).



**Figura 14.** Efeito do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* na expressão gênica de *Ppar $\gamma$*  relativa à  $\beta$ -actina. As culturas primárias de GRDs foram tratadas por 48 horas, a partir do 9º dia de cultura, com as concentrações 1, 3 e 9  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do extrato e por 24 horas e com cisplatina 30  $\mu\text{M}$  a partir do 10º dia de cultura. O controle foi pré-tratado com MeOH por 48 horas (9º dia de cultura) e cisplatina por 24 horas (10º de cultura). Os dados foram expressos como média  $\pm$  SEM, e analisados estatisticamente pelo método de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis \* $p < 0,05$  para as concentrações do extrato quando comparadas com o controle;  $n = 3 - 4$ .

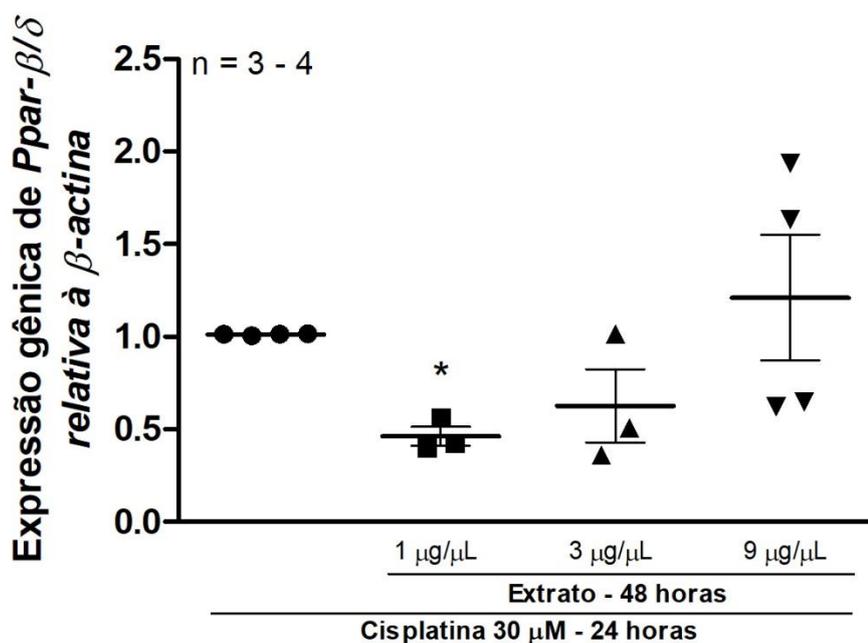
#### ***5.4 Avaliação do efeito do extrato de fungos endofíticos da Bauhinia variegata sobre a expressão gênica relativa de Ppar $\beta/\delta$***

Para avaliar se o tratamento com os extratos modula a expressão gênica de *Ppar $\beta/\delta$*  nas células de GRDs tratadas com cisplatina, foi realizado o método de RT-PCR-q. A curva de amplificação e a curva de dissociação das cópias de RNA de *Ppar $\beta/\delta$*  são representadas pela **Figura 15**, assim como nos experimentos anteriores a presença de um único pico na curva de dissociação indicando que o par de *primer* não formou dímeros.



**Figura 15.** Curva de amplificação e dissociação do *primer* de *Ppar $\beta/\delta$* . A) Curva de amplificação e B) Curva de dissociação (*Melting Curve*).

Na **Figura 16** é possível observar que a concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* diminuiu a expressão de *Ppar $\beta/\delta$*  em relação ao controle ( $p<0,05$ ). O tratamento com as concentrações de  $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e  $9\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do extrato não alteraram a expressão de *Ppar $\beta/\delta$*  quando comparados ao grupo tratado com cisplatina.



**Figura 16.** Efeito do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* na expressão gênica de *Ppar $\beta/\delta$*  relativa à *β-actina*. As culturas primárias de GRDs foram tratadas por 48 horas, a partir do 9º dia de cultura, com as concentrações 1, 3 e  $9\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do extrato e por 24 horas, a partir do 10º dia de cultura, com cisplatina  $30\mu\text{M}$ . O controle foi pré-tratado com MeOH por 48 horas (9º dia de cultura) e cisplatina por 24 horas (10º dia de cultura). Os dados foram expressos como média  $\pm$  SEM, e analisados estatisticamente pelo método de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis \* $p<0,05$  para as concentrações do extrato quando comparadas com o controle;  $n = 3-4$ .

## 6. DISCUSSÃO

A NPIQ afeta muitos pacientes em todo o mundo e como demonstram os dados epidemiológicos referentes ao crescimento do número de casos de neoplasias para os próximos anos, este efeito adverso tende a atingir cada vez mais pessoas. A NPIQ interfere diretamente na qualidade de vida dos pacientes em uso de quimioterápicos e dessa forma, é de suma importância que novas formas de tratamento e/ou prevenção sejam estudadas. Dentro da biodiversidade brasileira estão inseridas inúmeras espécies vegetais com grande potencial terapêutico. O extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata*, em estudos anteriores, apresentou atividade antioxidante em ensaios de peroxidação lipídica e sequestro de radical superóxido, assim como a capacidade de modular os receptores PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta/\delta$  em adipócitos e o receptor PPAR $\gamma$  em células mesangiais (Mesquita, 2012; Mesquita, 2015). Tendo em vista que estas duas atividades representam boas expectativas em relação ao tratamento da NPIQ, por apresentarem atividades que influenciam a resposta inflamatória, presente nesta condição, hipotetizamos que este extrato teria potencial para diminuir a neurotoxicidade causada pela cisplatina.

Para testar nossa hipótese, primeiramente avaliamos se a viabilidade celular poderia ser alterada com o tratamento por 48h com o extrato. Assim como em outros modelos celulares, em cultura de células de GRD o extrato não apresentou atividade citotóxica nas concentrações avaliadas. Araújo e colaboradores (2015) também avaliaram o efeito destes extratos na viabilidade de fibroblastos humanos e mostraram que mesmo em concentrações superiores às utilizadas neste trabalho (25  $\mu$ g por 72h) os extratos não foram citotóxicos.

O PPAR $\gamma$  é conhecido por suas atividades na regulação do gasto energético em adipócitos e por sua ação anti-inflamatória ao regular a diferenciação de macrófagos

negativamente (Ricote et al., 1998). Este receptor também atua como antagonista de fatores transcricionais de citocinas como o NF- $\kappa$ B ao inibir a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  (Su, et al., 1999). Embora possua efeitos anti-inflamatórios bem estabelecidos, como redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$  e algumas interleucinas (IL-1, IL-6), o PPAR $\gamma$  também possui sua expressão modulada negativamente por esses mesmos mediadores em adipócitos (Chinetti, et al., 2000; Tyagi, et al., 2011). Dessa forma, o aumento da expressão desse receptor pode representar a necessidade de defesa celular contra injúrias consequentes do processo inflamatório, visto que alguns dos seus ligantes naturais são mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1, cuja ação induz a inibição da trans-ativação do PPAR $\gamma$  em células da medula óssea (Suzawa, et al., 2003).

Observamos que em nosso modelo experimental, as menores concentrações dos extratos promoveram redução da expressão de *Ppar $\gamma$* . Tendo em vista que o tratamento com a cisplatina induz uma diminuição do RNAm de *Ppar $\gamma$*  e que, consideramos este parâmetro como neurotóxico, essas concentrações demonstraram um agravamento desta condição. Ainda, a concentração de 9 $\mu$ g/ $\mu$ L não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. A hipótese inicial do trabalho era a de que o extrato pudesse aumentar a expressão de *Ppar $\gamma$*  e corroborar os dados da literatura que sugerem que o aumento da expressão deste receptor ocorre em processos de injúria neuronal.

A isoforma PPAR $\beta/\delta$  também apresenta atividade anti-inflamatória e é expressa em diversos tecidos, além de apresentar atividade neuroprotetora por exercer atividade regulatória negativa sobre caspases (Iwashita et al., 2007). Os resultados obtidos em relação à expressão gênica do *Ppar $\beta/\delta$*  mostraram que as maiores concentrações do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* (3 $\mu$ g/ $\mu$ L e 9 $\mu$ g/ $\mu$ L) não alteraram sua expressão. Enquanto a menor concentração do tratamento levou à diminuição da expressão. Alguns autores relacionam como consequência da atividade pós-transcricional de genes sua

degradação e/ou supressão (Keene, 2007; Anderson, 2010). Embora não existam trabalhos que abordem esse controle na expressão gênica de PPAR, isso poderia explicar a redução da expressão gênica observada em nossos resultados.

Dessa forma, para esclarecer essa hipótese, seria necessária a avaliação da atividade pós-transcricional deste gene, após tratamento com extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* e cisplatina, como o estudo da atividade do receptor e sua expressão proteica. Além do estudo da atividade dos receptores PPAR após tratamento com o extrato, a avaliação de outros marcadores de funções e proteínas envolvidas na resposta anti-inflamatória e na resposta ao estresse oxidativo, poderiam indicar se o extrato apresenta atividade neuroprotetora, como descrito a seguir.

A cisplatina além de ativar proteínas pró-inflamatórias, também atua produzindo ERO, que causam desbalanços mitocondriais e ativam proteínas pró-apoptóticas (Kruidering et al., 1997). Além da avaliação da expressão gênica dos receptores PPAR, outras vias inflamatórias, como a Keap1-NRF-2-ARE, responsável pela regulação de agentes neutralizadores de ERO, podem ser avaliadas afim de testar a atividade neuroprotetora do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* (Lu et al., 2016). Dentre os marcadores avaliados na resposta antioxidante dessa via, é possível avaliar a atividade enzimática de proteínas como a superóxido-dismutase, glutathiona peroxidase e a catalase. Em estudos anteriores o extrato apresentou atividade antioxidante, corroborando a hipótese de que o extrato possa atuar inibindo o estresse oxidativo, gerado pela cisplatina (Mesquita, 2012).

Além das hipóteses supracitadas, acreditamos que utilizando maiores concentrações do extrato de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* nos tratamentos seja possível observar o aumento da expressão gênica dos receptores estudados. Isso porque os valores de

*p* que encontramos foram de 0,0750 e 0,1171 para a dose de 9 $\mu$ g/ $\mu$ L (em *Ppar $\beta$ / $\delta$*  e *Ppar $\gamma$* , respectivamente), com um número amostral de 3-4 animais. É possível também que o aumento no número de animais por condição experimental altere estes resultados. Não encontramos nenhum dado na literatura que pudesse esclarecer porque as concentrações menores dos extratos diminuíram a expressão gênica de PPAR, assim é objetivo do grupo realizar uma nova curva dose resposta com mais concentrações a serem testadas e também com a análise de outros marcadores de atividade neurotóxica da cisplatina para comparação.

O aprofundamento no entendimento das ações exercidas por este extrato pode abrir portas para o descobrimento de novas alternativas para o tratamento e para a prevenção da NP, que ainda não possui alternativas terapêuticas satisfatórias (Hershman et al., 2014). Embora os resultados não apresentem aumento da expressão gênica do RNAm dos receptores *Ppar $\gamma$*  e *Ppar $\beta$ / $\delta$* , o extrato sugere diversas possibilidades de ação, principalmente em relação a sua ação antioxidante já descrita anteriormente, podendo ser utilizado para a neutralização das ERO (Mesquita, 2012). A biodiversidade brasileira já deu exemplos de medicamentos bem-sucedidos desenvolvidos a partir de sua flora. Apesar disso, novas substâncias devem ser estudadas para que todo esse potencial seja bem explorado, o desenvolvimento de opções de tratamento para pacientes que sofrem com a NPIQ é uma forma de aproveitar todo esse potencial, além de contribuir para uma melhor qualidade de vida de pacientes afetados por esse evento adverso.

## 7. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos nesse trabalho é possível afirmar que os extratos, nas concentrações utilizadas, não induziram morte celular. No entanto, reduziram a expressão gênica de *Ppar* $\beta/\delta$  e *Ppar* $\gamma$ , sem apresentar atividade neuroprotetora para o tratamento com cisplatina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, S. K. A Histochemical Approach to the Mechanism of Action of Cisplatin and Its Analogues. **J Histochem Cytochem**. 1993;41(7):1053-73.
- AGGARWAL, S. K. Calcium Modulation of Toxicities Due to Cisplatin. **Met Based Drugs**. 1998;5(2):77-8.
- ALBERS et al. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. **Cochr Database Syst Rev**. 2013; (2): CD005228.
- ANDERSON, P. Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**. 2010; 10(1):24-35.
- ARAÚJO, L. M., Avaliação da expressão gênica de colágeno em fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos [dissertação]. 2015. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília
- ARGYRIOU., A. A., et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2012; 82(1):51-77.
- AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Elect Journ Biot**, 2000; 3(1): 15-16.
- BARRA et al. Mecanismo Molecular da Ação do Hormônio Tireoidiano. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2004; 48(1).
- BENNET et al. Impact of oxaliplatin-induced neuropathy: a patient perspective. **Sup. Car Can** 2012; 20:2959–291167.
- BRUNA & VELASCO. Sigma-1 receptor: a new player in neuroprotection against chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Neural Regen Res**. 2018; 13(5):775-778.

BURKEY, T. H. et al. Isolation and culture of sensory neurons from THE dorsal-root ganglia of embryonic or adult rats. **Methods Mol Med**, 2004; 99: 189-202.

CAROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, 1988; 69(1): 2-9.

CAROZZI, V. A. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neurosci Lett**. 2015; 2(96):90-107.

CARVALHO et al. The use of antioxidant agents for chemotherapy-induced peripheral neuropathy treatment in animal models. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2017; 44: 971–979.

CAVALETTI & MARMIROLI. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in the era of pharmacogenomics. **Lancet Oncol**. 2011; 12: 1151–61.

CAVALETTI et al. Morphometric study of the sensory neuron and peripheral nerve changes induced by chronic cisplatin (DDP) administration in rats. **Act. Neuropath**. 1992; 84: 364-371

CENTRO DE SENSORIAMENTO REMOTO - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (CSR/Ibama). Monitoramento dos biomas brasileiros por satélite: Monitoramento do bioma Cerrado. Dados Revisados. Brasília: CRS/ IBAMA 2010: 67.

CHINETTI, G. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. **Inflamm. res**. 2000; 49: 497–505.

CERSOSIMO, Oxaliplatin-Associated Neuropathy: A Review. **Ann Pharmacother** 2005; 39:128-35.

DASARI, S; TCHOUNWOU, PB. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**. 2014; 740:364–78.

DiRENZO et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Retinoic Acid Receptors Differentially Control the Interactions of Retinoid X Receptor Heterodimers with Ligands, Coactivators, and Corepressors. **Mol and Cel Biol**. 1997; 17(4): 2166–2176.

DUARTE et al. Bauhinia variegata: Diagnose Morfoanatômica e Análise Comparativa entre Exemplares de Regiões Climáticas Distintas. **Lat. Am. J. Pharm**. 2007; 26 (6): 837-45.

EASTMAN, A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. **Pharmacol Ther**. 1987; 34(2):155-66.

FALCONE et al. PPARb/d and g in a Rat Model of Parkinson's Disease: Possible Involvement in PD Symptoms. **Journal of Cellular Biochemistry** 2015; 116:844–855.

FALLON, MT. Neuropathic pain in cancer. **British Journal of Anaesthesia** 2013; 111(1): 105–11.

FEHRENBACHER, JC. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Progr Mol Biol Transl Scie Els Inc**. 2015; 131(1): 471-508.

GRISOLD et al. Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: Diagnosis, treatment, and prevention. **Neuro Oncol**. 2012; 14(4):45-54.

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**. 2014; 32:1941-1967.

HWANG, J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligands regulate endothelial membrane superoxide production. **Am J Physiol**. 2005; 288: C899-C905.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). ABC do Câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2012; 2: 129.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/ Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: 2018

IWASHITA, A. et al. Neuroprotective Efficacy of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\delta$  -Selective Agonists in Vitro and in Vivo. **Journ. Pharm. Exper. Ther.** 2007; 320(3).

JIANG et al. Implications of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease in Reactive Oxygen Signaling Response after Cisplatin Treatment of Dorsal Root Ganglion Neurons. **Cancer Res.** 2008; 68:6425-6434.

KAPADIA, R. et al., Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. **Front Biosci.** 2009;13: 1813–1826.

KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nature Rev. Genet.** 2007; 8: 533–543.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nat Ver. Cancer.** 2007; 7(8):573–84.

KLINK & MACHADO. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conserv Biol,** 2005; 19(3): 707–713.

KRIS et al. Chemotherapy for Lung Cancers: Here to Stay. **Amer Soc Clin Oncol.** 2014; 375-80.

KRUIDERING et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells. Mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1997; 280: 638–49.

KRUKOWSKI et al. Prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy by the small-molecule inhibitor Pifithrin- $\mu$ . **PAIN.** 2015; 156(11): 2184–2192.

LAUDET et al. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **The EMBO Journal.** 1992; 11 (3): 1003 – 1013.

LIMA, C. L. Efeitos da rosiglitazona, agonista do receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais, sobre a proliferação e expressão do TGF $\beta$ 1 em cultura primária de células da polpa dentária humana [dissertação]. 2011. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

LoMONACO et al. Cisplatin neuropathy: clinical course and neurophysiological findings. **J Neurol.** 1992; 239: 199-204.

LU et al., The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. **Med Res Rev.** 2016; 36(5):924-63.

MAGELSDORF et al. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. **Cell.** 1995; 83: 835-839.

MESQUITA, P. G. Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata* - busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes [dissertação]. 2012. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

MESQUITA, P. G. Avaliação de atividade antioxidante e atividade agonista em receptores nucleares PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$  de metabólitos de fungos endofíticos isolados de folhas da

Bauhinia variegata: Brasília, 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MILTON, FA. Avaliação do perfil de expressão gênica modulado pelo GQ-16 em adipócitos 3T3-L1 utilizando a técnica de microarranjo, 2015.

MISHRA et al. *Bauhinia variegata* Leaf Extracts Exhibit Considerable Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Activities. **Biomed Res Int.**; 2013: 915436.

MO et al. Prevention of paclitaxel-induced peripheral neuropathy by lithium pretreatment. **FASEB J.** 2012; 26(11): 4696–4709.

MOLLMAN, J. E. Cisplatin Neurotoxicity. **N Engl J Med.** 1990;322(2):126-7.

OLIVEIRA, H. R. Avaliação do Papel do PPAR $\gamma$  em Modelo de Neuropatia Periférica Induzida por Cisplatina *in vitro*. [dissertação]. Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília.

PARK et al. Chemotherapy-Induced Peripheral Neurotoxicity: A Critical Analysis. **CA Cancer J Clin** 2013; 63:419–437.

PETTERSSON et al. Symptom prevalence, frequency, severity, and distress during chemotherapy for patients with colorectal cancer. **Sup. Car. Can.** 2013; 22(5): 1171-9.

RAHIB, L. et al., Projecting Cancer incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and pancreas Cancers in the United States. **American Society for Cancer Research.** 2014; CAN-14-0155.

RANCOULE, C. et al. Les 50 ans du cisplatine. **Bull Cancer** 2016; 103(10): 167-176.

RASTINEJAD, F. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. **Curr. Opin. Struc. Biol.** 2001; 11:33–38.

RAPOPORT et al. When and How Do I Use Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer? **Curr. Treat. Opt. Onc.** 2014; 15:86–98.

RICOTE & GLASS. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. **Biochim Biophys Acta.** 2007; 1771(8): 926–935.

RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. **Nat.** 1998.

ROSENBERG, B. et al. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nat.** 1965; 205:698–9.

RUKACHAISIRIKUL et al. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15 **Phytoch.** 2007; 69 (2008) 783–787.

SCHRÖDER et al. Can Medical Herbs Stimulate Regeneration or Neuroprotection and Treat Neuropathic Pain in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy? **Evid-Bas Compl Altern Med.** 2013; 2013: 423713.

SERETNY et al. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. **PAIN** 2014; 155: 2461–2470.

SILVA et al. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. **Rev. Bras. Pl. Med.** 2015; 17(4): 1016-1030.

STAFF et al. Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Current Review. **Ann Neurol.** 2017; 81(6):772-781.

STRUMBERG et al. Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. **Ann. Oncol.** 2002; 13: 229–236.

SU, G. C. et al., A novel therapy for colitis utilizing PPAR- $\gamma$  ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. **J. Clin. Invest.** 1999; 104:383-389.

SONG & ZHANG. Experimental animal study of docetaxel combined with carboplatin in the treatment of retinoblastoma. **Oncol Lett.** 2018; 16(1): 235–238.

SUZAWA, M. et al., Cytokines suppress adipogenesis and PPAR- $\gamma$  function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. **Nat. Cell Biol.** 2003; 5: 224 - 230.

TA, L. E., et al. Transient receptor potential vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. **Mol. Pain.** 2010; 6: 15.

TAVARES, V., HIRATA, M., HIRATA, R. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ): Molecular study In Glucose Homeostasis, Lipid Metabolism and Therapeutic Approach. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2007; 51(4):526-533.

TOMASZEWSKI, A., BÜSSELBERG, D. Cisplatin modulates voltage gated channel currents of dorsal root ganglion neurons of rats. **Neurotoxicology.** 2007; 28(1):49-58.

TYAGI, S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. **Journ Adv. Pharma. Techn. & Res.** 2011; 2.

WÓJCIK, M. F. R. de S. & MATHEUS, M. E. Perspectivas terapêuticas na prevenção da neuropatia periférica induzida por quimioterápicos (NPIQ). **Rev. Bras. Farm.** 2011; 92(4): 262-268.

XU et al. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. **Curr. Opin. Gen. Dev.** 1999; 9:140- 147.

ZHANG, L. Z-Y et al. The Possible involvement of JKN activation in the spinal dorsal horn in bortezomib-induced allodynia: the role of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . **J Anesth.** 2015; 30(1):55-63.

## 9. ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

Brasília, 02 de julho de 2014.

### *DECLARAÇÃO*

Declaramos que o projeto intitulado "**ESTUDO DE PRODUTOS NATURAIS DO BIOMA CERRADO COM POTENCIAL ATIVIDADE DE NEUROPROTEÇÃO**", UnBDoC n.º 51793/2014, 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.

Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior  
Coordenador da CEUA

\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.