



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

ANDRESSA LETÍCIA RODRIGUES BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA MOLÉCULA
LDT 409 EM MODELO DE NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR
CISPLATINA**

BRASÍLIA, DF
2019

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA MOLÉCULA
LDT 409 EM MODELO DE NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR
CISPLATINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para obtenção do grau de Bacharel
em Farmácia, na Universidade de
Brasília, Faculdade de Ciências da
Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Djane Braz Duarte
Co-orientador: Me. Henrique Rodrigues de Oliveira

BRASÍLIA, DF

2019

ANDRESSA LETÍCIA RODRIGUES BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA MOLÉCULA
LDT 409 EM MODELO DE NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR
CISPLATINA**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Djane Braz Duarte
(FS/Universidade de Brasília)

Me. Manuel Humberto Mera Lopez
(FS/ Universidade de Brasília)

Me. Bruna Rafaela Bezerra Gomes
(FCE/ Universidade de Brasília)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre ter me guardado, me cuidado, me dado forças quando eu já não era capaz de continuar, por ser meu refúgio em meio a tantos momentos difíceis e por jamais me ter desamparado. Obrigada por minha existência, pelas pessoas maravilhosas que fazem parte da minha vida e que tanto me ajudaram. Obrigada Senhor por todas as bênçãos e por ter me permitido chegar até aqui.

Ao Wagner, meu melhor amigo e irmão de alma que sempre me apoiou em tudo e me motivou. Quem eu sempre pude contar nos piores momentos da minha vida, que compartilhou das minhas alegrias comigo, que me fez rir muito durante esses doze anos de amizade e que consegue me alegrar e me divertir nas situações mais inusitadas. À sua esposa, Mariana, por ter me acolhido em seu lar no momento em que mais precisei, por sempre ser tão gentil, divertida e me tratar tão bem. Sem vocês dois nada disso seria possível, serei eternamente grata.

Ao Mateus, meu companheiro, que também tem sido minha família, por cuidar de mim, por todo carinho, por me fazer bem, por todos os momentos bons e por ter me dado toda ajuda e suporte necessário num momento tão decisivo em minha vida. Muito obrigada por tudo, amor.

A minha mãe, Andréa, por ter me apoiado e me ajudado a realizar esse sonho, por acreditar no meu potencial e por sempre crer que daria certo. Obrigada mãe, por tudo que já fez por mim e passou por minha causa, admiro muito toda a força que teve tem até hoje. Ao meu irmão Gustavo. À minha querida e amada avó, Maria, que sempre intercedeu por mim, se preocupou comigo, cuidou de mim e me tratou tão bem desde o meu nascimento. Às minhas tias, Adriana, Silvana e Tatiana por sempre terem sido boas para mim e torcerem pelo meu sucesso.

A minha querida amiga Maria (Mary), que foi tão companheira e presente durante todo o início deste curso, que me ajudou em tudo, me apoiou, me incentiva e me motiva até hoje. Obrigada por ser tão bondosa comigo, por eu sempre poder contar contigo, por sempre me escutar e me fazer rir. Você sempre me fez tão bem!

A minha orientadora, Professora Djane Braz Duarte, quem eu tanto admiro como cientista, como docente e como pessoa, com quem eu tive a valiosa

oportunidade de poder aprender tanto! Obrigada por ter me apresentado a esse fascinante mundo da ciência. Obrigada por toda paciência, por todos os ensinamentos e por toda fundamental contribuição na realização deste trabalho. Obrigada por ter sido uma excelente orientadora, por ser uma pessoa tão alegre e divertida que tornou toda essa jornada menos tensa. Obrigada por ser uma mulher em quem eu possa me inspirar tanto.

Ao Jonathan (Jhon), meu amigo de longa data, companheiro de R.U. e das disciplinas mais complicadas. Obrigada por ser uma ótima companhia durante todo esse tempo, por compartilhar comigo as mesmas preocupações e dificuldades, principalmente na vida acadêmica, por todas as conversas, risadas e por sempre me escutar.

Ao meu co-orientador, Mestre Henrique Rodrigues de Oliveira, por ser sempre solícito, por toda disposição em nos ajudar, todos os ensinamentos, os momentos descontraídos, por me fazer rir tanto, mesmo me irritando (muitas) vezes. Brincadeiras a parte, muito obrigada por tudo, esse trabalho não teria se realizado sem toda sua ajuda.

Ao Gabriel, colega de laboratório que também encarou essa desafiante jornada desde os experimentos até finalizarmos nossos trabalhos. Aos outros alunos do nosso grupo de pesquisa, Denyse, Bárbara e Paulo, por todo aprendizado que tivemos juntos.

Aos mestres Manuel Humberto Mera Lopez e Bruna Rafaela Bezerra Gomes, por aceitarem compor a banca examinadora deste trabalho e por doarem seu tempo para engrandecer este trabalho.

À Universidade de Brasília por ter sido meu segundo lar durante esses seis anos e por possibilitar a minha formação neste curso que tanto amo. A todos os docentes do curso de Farmácia que compartilharam um pouco de seus valiosos conhecimentos comigo, vocês foram fundamentais em todo o processo de aprendizagem que me permitiu concluir esta etapa. A todos do FarMol, tão prestativos, especialmente Carol, Isadora, Simone e Amandda que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

A equipe do laboratório de Análises Clínicas do HUB e aos estagiários (1/2019) Denyse, Larissa, Gabriel e Hugo. Obrigada por me receberem tão bem, por me ensinarem tanto e mesmo com minha rotina tão exaustiva conseguirem tornar as manhãs do meu último semestre de curso tão divertidas. Obrigada por todo

conhecimento, pela paciência, pela hospitalidade e pelas boas risadas, especialmente Geovanne, Alceu, Fernando, Robério, Gláucia, Zelita, Diego, Messias, Franco, Silas, Erika e Luciane.

Enfim, obrigada a todos que torceram pelo meu sucesso.

“Tente mover o mundo - o primeiro passo será mover a si mesmo.”

Platão

RESUMO

A neurotoxicidade é um efeito adverso comum que ocorre devido ao uso de algumas classes de quimioterápicos, como por exemplo, os derivados de platina (cisplatina, oxaliplatina e carboplatina). Esse efeito adverso é chamado de Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia (NPIQ) quando atinge o Sistema Nervoso Periférico (SNP) e é caracterizada por perda sensorial, parestesia e dor neuropática, que prejudica tanto a terapia antitumoral quanto a qualidade de vida dos pacientes. Uma das maneiras de prevenir ou reverter esse efeito é através da neuroproteção. No presente trabalho, foi avaliada a potencial ação neuroprotetora do LDT 409 (composto sintetizado a partir de uma molécula isolada do líquido extraído da casca da castanha de caju), que em estudos prévios demonstrou atividade antioxidante e diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Assim, avaliamos se o LDT 409 seria capaz de prevenir a neurotoxicidade induzida pela cisplatina, que dentre outras alterações, promove aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e inibição da neuritogênese *in vitro*. Dessa forma, para responder aos objetivos propostos, foi avaliada em células PC12 a viabilidade celular através da técnica de exclusão por azul de tripano, a quantificação gênica de GAP-43 (marcador de neuroplasticidade) pela técnica de RT-PCRq em tempo real e a avaliação da morfologia e neuritogênese por microscopia óptica. Foi observado que 150 μM de cisplatina induziu morte celular, diferentemente do tratamento com LDT 409, que não se mostrou citotóxico nas concentrações testadas. A cisplatina na concentração de 50 μM diminuiu a expressão de GAP-43, enquanto a concentração de 150 μM não promoveu alteração da expressão gênica. Investigamos então se o LDT seria capaz de prevenir o efeito da cisplatina (50 μM) na expressão gênica de GAP-43 e observamos que o LDT 409 não preveniu esse efeito. Mesmo que a maior concentração de cisplatina não tenha alterado a expressão gênica de GAP-43, o co-tratamento com LDT 409 aumentou a expressão desse gene. A cisplatina (150 μM) aumentou tanto o tamanho nuclear quanto celular, além de alterar o formato dessas células tornando-as esféricas. Além disso, verificamos se o LDT 409 possuía atividade neuritogênica e observamos que o composto não induziu o crescimento de neuritos. Assim, de acordo com os ensaios realizados, o LDT 409 não demonstrou

efeito neuroprotetor em modelo de neurotoxicidade *in vitro* induzido por cisplatina em células PC12.

Palavras Chaves: LDT 409; cisplatina; neurotoxicidade; neuroproteção; GAP-43.

ABSTRACT

Neurotoxicity is a common adverse effect that occurs with the use of some chemotherapeutic classes used, as an example, the platinum derivatives (cisplatin, oxaliplatin and carboplatin). This adverse effect is called Chemotherapeutic-Induced Peripheral neuropathy when affect the Peripheral Nervous System (PNS) and is characterized by sensory loss, paresthesia and neuropathic pain, with impairs the as antitumoral therapy as the patients quality of life. One way to prevent or revert this effect is through neuroprotection. In this work, was evaluated the potential neuroprotection action of LDT 409 (compound synthesized from a molecule isolated from the from the cashew nut shell liquid), which in previous studies showed antioxidant activity and reduced the pro-inflammatory cytokine expression. Thus, we evaluated whether the LTD 409 would be capable to prevent the cisplatin neurotoxicity, that among other alterations, induce an increase of pro-inflammatory cytokines and neuritogenesis inhibition *in vitro*. Therefore, to answer the proposed aims, was evaluated in PC12 cells the viability through Trypan blue exclusion, the genic expression of GAP-43 (a neuroplasticity marker) by real-time RT-PCRq and morphologic evaluation and neuritogenesis by optic microscopy. We observe the cisplatin 150 μ M induce cell death, differently the LTD 409 treatment, which did not was cytotoxic in the tested concentrations. The cisplatin 50 μ M decrease the GAP-43 gene expression, while the 150 μ M did not promote alterations on gene expression. We next investigate whether LDT 409 would be able to prevent the cisplatin effect (50 μ M) on the GAP-43 gene expression and we observed that LDT 409 did not prevent this effect. The highest cisplatin concentration did not alter the GAP-43 gene expression, however, the co-treatment with LDT 409 increased the gene expression of this gene. Cisplatin (150 μ M) increased both the nuclear and cellular size, besides changing the shape of these cells, making them spherical. In addition, we verified whether LDT 409 had neuritogenic activity and we observed that the compound did not induce neurite outgrowth. Thus, according to the performed assays, LDT 409 did not demonstrate a neuroprotective effect in a model of *in vitro* neurotoxicity induced by cisplatin in PC12 cells.

Keywords: LDT 409; cisplatin; neurotoxicity; neuroprotection; GAP-43.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1	Formação e efeito dos adutos DNA-Cisplatina;	21
Figura 2	Estrutura molecular do LDT 409;	26
Figura 3	Delineamento experimental - Toxicidade cisplatina;	36
Figura 4	Viabilidade celular de células PC12 tratadas com cisplatina; ...	37
Figura 5	Delineamento experimental - Viabilidade celular LDT409;	38
Figura 6	Viabilidade celular de células PC12 tratadas com LDT 409 ou cisplatina;	38
Figura 7	Expressão gênica relativa de GAP-43;	39
Figura 8	Delineamento experimental - LDT 409 na expressão do RNAm de GAP-43;	40
Figura 9	Expressão do RNAm de GAP-43 em células PC12 tratadas com cisplatina;	41
Figura 10	Morfologia das células PC12 tratadas com LDT e/ou cisplatina;	43
Figura 11	Morfologia das células PC12 tratadas com LDT e/ou cisplatina;	44
Figura 12	Delineamento experimental - Neuritogênese em células PC12 tratadas com LDT 409;	45
Figura 13	Porcentagem de células diferenciadas após tratamento com LDT 409;	46
Figura 14	Comprimento dos neuritos de células PC12 após tratamento com LDT 409;	47
Quadro 1	Relação dos pares de base de cada <i>primer</i> ;.....	33
Quadro 2	Reagentes utilizados por reação nos experimentos de RT-PCRq	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	<i>Adenosine-Monophosphate / Adenosina-Monofosfato</i>
ATC	Antidepressivos Tricíclicos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
CO₂	Dióxido de Carbono
CRL	<i>Cell Repository Line</i>
Ct	<i>Cycle threshold / Ciclo limiar</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase 1	Enzima Desoxirribonuclease 1
E.P.M.	Erro Padrão da Média
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
GAP-43	<i>Growth-Associated Protein 43 / Proteína Associada ao Crescimento 43</i>
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
HEPES	<i>(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid)</i>
IL-1β	Interleucina 1 Beta
LCC	Líquido da Casca da Castanha de Caju
N7	Nitrogênio do Carbono 7
NGF	<i>Nerve Growth Factor / Fator de Crescimento do Nervo</i>

NP	Neuropatia Periférica
NPIQ	Neuropatia Periférica Induzida por Quimioterapia
PB	Pares de Base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline / Tampão Fosfato-Salino</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCRq	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais
PPAR-α	Isoforma α do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais
PPAR-γ	Isoforma γ do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais
Pt	Platina
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RNAse	Ribonuclease
RNA_t	Ácido Ribonucleico Total
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT – PCRq	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
T_m	<i>Melting Temperature</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factors α</i>

USP

Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Neuropatia Periférica (NP)	18
1.2. Cisplatina	20
1.3. Proteína GAP-43	22
1.4. Tratamento da Neuropatia Periférica	22
1.5. Composto LDT 409	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo geral:	28
3.2. Objetivos específicos:	28
4. METODOLOGIA.....	31
4.1. Células PC12.....	29
4.2. Cultura de Células	30
4.2.1. Diferenciação Celular	30
4.3. Viabilidade Celular.....	31
4.4. Análise do Crescimento de Neuritos.....	31
4.5. RT – PCRq (Reação da Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)	31
4.6. Análise Estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Determinação da concentração tóxica de cisplatina em cultura de células PC12	36

5.2.	Efeito do LDT 409 na viabilidade celular	37
5.3.	Análise do efeito da cisplatina na expressão de RNAm da proteína GAP-43 em células PC12	39
5.4.	Análise do efeito do LDT 409 na expressão de RNAm da proteína GAP-43 em células PC12 tratadas com cisplatina	40
5.5.	Avaliação do efeito do LDT 409 na neuritogênese de células PC12 diferenciadas	45
6.	DISCUSSÃO	48
7.	CONCLUSÃO	52
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neuropatia Periférica (NP)

A neuropatia periférica é um termo geral que indica qualquer distúrbio do SNP - sistema nervoso periférico (MISRA *et al.*, 2008). É um distúrbio neurológico comum, com apresentação variável e inúmeras causas (MISRA *et al.*, 2008). Esta é uma condição definida pela degeneração ou disfunção dos nervos periféricos, em seu trajeto da medula espinhal até a periferia, podendo gerar sintomas motores, sensitivos ou autonômicos (DE AFONSECA *et al.*, 2010).

Quanto à sua etiologia, a neuropatia periférica pode também estar associada a condições patológicas, processos infecciosos ou inflamatórios, processos metabólicos e hereditariedade (para revisão ver MARTIN e SILVA, 2011). A neuropatia periférica induzida por quimioterapia (NPIQ) está associada a processos metabólicos, devido ao efeito tóxico de determinados quimioterápicos e sua interferência no metabolismo saudável da célula nervosa (para revisão ver MARTIN e SILVA, 2011).

A NPIQ é uma consequência relativamente comum e séria do tratamento do câncer e, muitas vezes é a principal razão para a redução ou descontinuação da terapia, podendo limitar o emprego de agentes quimioterápicos eficientes (PARK *et al.*, 2008).

Os sintomas são frequentemente incapacitantes, podendo afetar as atividades diárias dos pacientes devido à neuropatia periférica axonal predominantemente sensitiva, com distribuição predominante nos pés e mãos caracterizada por perda sensitiva, parestesia, frequentemente agravados pela dor neuropática (para revisão ver JAGGI e SINGH, 2012).

O desenvolvimento, a incidência e a gravidade da NPIQ dependem não apenas dos fatores de risco individuais, mas também da dose cumulativa, duração do tratamento, estrutura química da droga e terapias combinadas (para revisão ver CAROZZI *et al.*, 2015). A fisiopatologia exata não é clara e vários mecanismos

subjacentes diferentes têm sido propostos para diferentes classes de drogas anticâncer (para revisão ver CAROZZI et al., 2015).

Os mecanismos de ação das drogas quimioterápicas responsáveis pela citotoxicidade estão frequentemente ligados ao desenvolvimento de sua neurotoxicidade, o que implica a dificuldade óbvia de reduzir a toxicidade sem diminuir sua eficácia no câncer (para revisão ver CAROZZI et al., 2015). Esses mecanismos acontecem em diversos locais do SNP. Os gânglios da raiz dorsal (GRDs) são mais vulneráveis à agentes neurotóxicos já que não possuem uma barreira hematoencefálica (BHE) efetiva (ALLEN e KIERNAN, 1994), o que explica principalmente os sintomas sensoriais na NPIQ.

O desenvolvimento da NPIQ está comumente associado com fármacos anticancerígenos utilizados no tratamento de primeira linha de vários tipos de cânceres, como a vincristina, paclitaxel, oxaliplatina, cisplatina e bortezomibe (JAGGI e SINGH, 2012).

Os compostos de platina (Pt) pertencem a uma família de compostos usados no tratamento de vários tipos de tumores sólidos (por exemplo, mama, cólon, pulmão, testicular). Eles agem interagindo com o DNA formando adutos de Pt-DNA **Figura 1** que resultam na morte celular apoptótica de células cancerígenas (para revisão ver CAROZZI et al., 2015).

Os GRDs são considerados os alvos primários dos fármacos derivados da Pt (referente ao sistema nervoso), que causam apoptose em neurônios sensitivos, além de alterações morfológicas no nucléolo, gerando danos no DNA devido à formação de adutos de Platina-DNA. (MCDONALD e WINDEBANK, 2002). O DNA dos neurônios do SNP é mais suscetível a sofrer danos induzidos quimicamente devido à falta de proteção da BHE e, além disso, os GRDs são vascularizados por capilares fenestrados que os tornam mais acessíveis aos compostos circulantes, incluindo substâncias exógenas, como os fármacos derivados da Pt (para revisão ver CAROZZI et al., 2015).

Esses fármacos causam uma neuropatia sensitiva determinada por dano primário aos neurônios sensitivos do GRD, o que leva a uma degeneração axonal anterógrada, característica que dificulta no planejamento do tratamento neuroprotetor (CAVALETTI,1992). Geralmente, a NP induzida por Pt é caracterizada por parestesia nas extremidades distais, desenvolvimento de perda proprioceptiva, arreflexia e ataxia sensitiva (MOLLMAN, 1988). Sintomas de dor

neuropática são relatados frequentemente, mesmo após a descontinuação do tratamento (LOMONACO, *et al.*, 1992). Considerando todos os efeitos neurotóxicos, é importante ressaltar que as intervenções para reduzir ou evitar a neurotoxicidade, como tratamentos com antidepressivos, anticonvulsivantes, analgésicos opióides e anestésicos locais ainda não tiveram êxito (para revisão ver CAROZZI *et al.*, 2015).

1.2. Cisplatina

A cisplatina possui um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos de amônia **Figura 1** (para revisão ver ELJACK, *et al.*, 2014). Sua ativação ocorre quando atravessa a membrana celular, por difusão passiva ou ativa através de transportadores de cobre e transportadores de cátions orgânicos. No citoplasma, seus átomos de cloro são substituídos por moléculas de água e, este produto hidrolisado é altamente reativo nos centros nucleofílicos de biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e membranas fosfolipídicas (MENDONÇA, 2008; para revisão ver ELJACK, *et al.*, 2014).

O produto de hidrólise da cisplatina liga-se a posição N7 das purinas no DNA, formando os adutos que interferem na replicação do DNA, através do bloqueio da enzima DNA polimerase, podendo também inibir a transcrição, levando ao bloqueio do ciclo celular e apoptose. (WOZNIAK *et al.*, 2004; JAMIESON e LIPPARD, 1999).

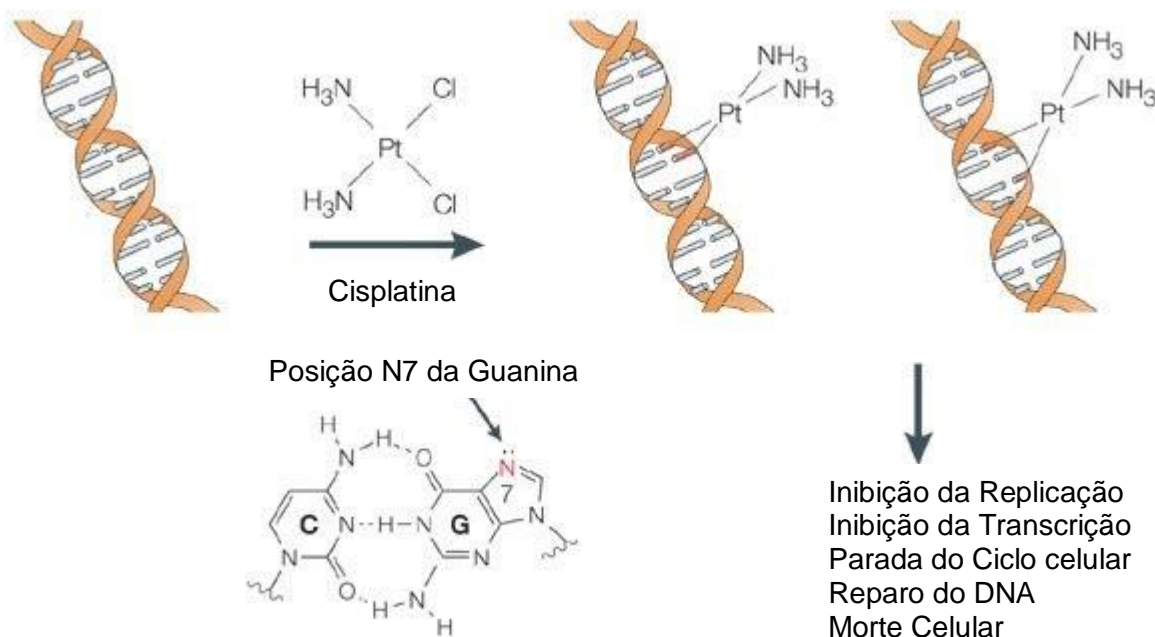


Figura 1: Formação e efeito dos adutos DNA-Cisplatina. O átomo de Pt da Cisplatina se liga covalentemente a posição N7 das purinas. Os adutos DNA-Cisplatina geram respostas celulares como inibição da replicação celular e transcrição, parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose. (Adaptado de WANG; LIPPARD, 2005).

O mecanismo da lesão neuronal causada pela cisplatina ainda não foi totalmente elucidado, assim como também não foi esclarecido se a neurotoxicidade da cisplatina ocorre através de seus mecanismos antitumorais (GORGUN *et al*, 2017). No tratamento com a cisplatina, o acúmulo de adutos de Pt-DNA é maior nos neurônios do GRD do que em qualquer outro tecido, além da gravidade da neurotoxicidade estar relacionada com a quantidade de adutos que é formada nas células nervosas (CAROZZI, *et al*. 2015).

A cisplatina atua diretamente nos nervos sensoriais e gera efeitos tóxicos que são caracterizados por degeneração axonal distal, que pode progredir para degeneração de corpos celulares e morte celular, além de causar a apoptose de neurônios do gânglios da raiz dorsal (CAROZZI, *et al*. 2015; MCDONALD, *et al*., 2002).

Foi demonstrado que a cisplatina inibe a neuritogênese (sequência de eventos que leva à formação de neuritos) *in vitro*, além de causar danos no DNA mitocondrial de neurônios do GRD devido a formação dos adutos de Pt-DNA, o que afeta a replicação e transcrição do DNA mitocondrial, levando a disfunção

mitocondrial nesses neurônios (FERREIRA, *et al.*, 2016).

1.3. Proteína GAP-43

A proteína associada ao crescimento GAP-43 (do inglês Growth-Associated Protein 43) possui 43 kDa e faz parte das fosfoproteínas que contribuem para a plasticidade e crescimento do terminal pré-sináptico (para revisão ver HOLAHAN, 2017). Esta fosfoproteína pré-sináptica atua em um conjunto maior de proteínas e quinases que coordenam mudanças na estrutura e função axonal durante os processos de neuroplasticidade. (para revisão ver HOLAHAN, 2017).

Existe uma relação estreita entre a expressão de GAP-43 e plasticidade estrutural axonal durante o desenvolvimento, um aumento nos seus níveis de expressão após lesão axonal durante a fase de regeneração e em processos neuroplásticos (DENNY, 2006). As atividades funcionais da GAP-43 podem ser atribuídas à regulação transcricional e pós-transcricional de seu RNA mensageiro (RNAm - para revisão ver HOLAHAN, 2017). A expressão gênica e transcricional do RNAm de GAP-43 é restrita ao sistema nervoso, em particular nos axônios, onde os níveis aumentam durante os períodos que ocorrem crescimento de neuritos (KARNS *et al.*, 1987).

Desta forma, a quantificação da expressão do RNAm da proteína GAP-43 é uma ferramenta útil para a avaliação da atividade neurotóxica e neuroprotetora de compostos testados *in vitro*.

1.4. Tratamento da Neuropatia Periférica

Os tratamentos para a NPIQ disponíveis atualmente são sintomáticos

(STAFF *et al.*, 2017). Os medicamentos utilizados nesse tratamento não são específicos para a NPIQ, são fármacos indicados para outras formas de dor neuropática, como antidepressivos, anticonvulsivantes, analgésicos opióides e anestésicos locais (HENNEMANN-KRAUSE e SREDNI, 2016). Ainda não existem tratamentos preventivos para a NPIQ devido à falta de compreensão de como drogas direcionadas à morte de células cancerosas que se dividem rapidamente, também têm como alvo os neurônios pós-mitóticos. (STAFF *et al.*, 2017). A utilização de agentes na prevenção da NPIQ se torna complicada devido A possibilidade de que esses agentes possam também diminuir a eficácia do tratamento antineoplásico (STAFF *et al.*, 2017). Os ensaios de agentes preventivos para NPIQ como o ácido alfa-lipóico, cálcio/magnésio intravenoso, vitamina E, acetil-L-carnitina ou glutatona não mostraram benefícios consistentes e/ou conclusivos clinicamente significativos na comparação dos controles com placebo (HERSHMAN *et al.*, 2014; STAFF *et al.*, 2017).

Alguns antidepressivos tricíclicos (ATC) como a amitriptilina e a nortriptilina, têm sido empregados no tratamento da dor neuropática, mas não especificamente pela induzida pela quimioterapia (HENNEMANN-KRAUSE e SREDNI, 2016). Os mecanismos analgésicos destes fármacos estão no nível central do sistema nervoso, inibindo a recaptação de norepinefrina e serotonina, e a ativação de vias inibitórias da dor (KRAYCHETE *et al.*, 2003). Os efeitos analgésicos periféricos antidepressivos tricíclicos têm sido atribuídos à diminuição de Adenosina monofosfato (AMP) cíclico via ativação do receptor de adenosina e inibição dos canais de sódio dependentes de voltagem (KRAYCHETE *et al.*, 2003). Entretanto, a utilização destes fármacos é limitada devido ao seu início de ação lento e aos efeitos adversos, como confusão mental, tontura, sedação, retenção urinária e toxicidade cardíaca (O'CONNOR e DWORKIN, 2009).

Os anticonvulsivantes como a gabapentina, pregabalina, carbamazepina, fenitoína e lamotrigina agem diminuindo a hiperexcitabilidade neuronal através da inibição de canais de cálcio ou de sódio e também são empregados no tratamento de dor neuropática (HENNEMANN-KRAUSE e SREDNI, 2016). Alguns destes, como a carbamazepina e a fenitoína possuem alto índice de efeitos adversos. Embora a carbamazepina proporcione alívio limitado da dor neuropática, ela possui janela terapêutica estreita, o que dificulta o tratamento (DWORKIN *et al.*, 2010).

A gabapentina e a pregabalina, geram menor índice de efeitos adversos e se

mostraram eficazes no tratamento de dor neuropática de etiologias distintas da NPIQ, mas ainda podem causar tontura, sedação e edema periférico, além de terem sido ineficazes no tratamento da NPIQ em estudos clínicos assim como a lamotrigina (HENNEMANN-KRAUSE e SREDNI, 2016; HERSHMAN *et al.*, 2014).

Os analgésicos opióides como a morfina, oxicodona, metadona ou tramadol, são tratamento de segunda linha para dor neuropática (O'CONNOR e DWORKIN, 2009). Estes fármacos são analgésicos devido à ação agonista de receptores opióides localizados no Sistema Nervoso Central (SNC) ou SNP e devido a sua ação supra medular, ocorre a ativação de vias descendentes inibitórias envolvidas no controle da dor. Mesmo com a alta eficácia contra a dor de diferentes etiologias, os opióides possuem alto potencial para gerar dependência e tolerância, o que limita seu uso contínuo, além dos efeitos indesejados como náuseas, vômitos, constipação, sonolência e tontura (HENNEMANN-KRAUSE e SREDNI, 2016).

É importante salientar que todo fármaco utilizado a fim de tratar ou prevenir a NPIQ deve, além de reduzir a neurotoxicidade proveniente da quimioterapia, manter a atividade anticancerígena do quimioterápico sem diminuí-la ou prejudicá-la.

Embora tenham sido tentados vários tratamentos neurotróficos, neuroprotetores ou antioxidantes para prevenir ou tratar a neuropatia, como os citados anteriormente, eles ainda possuem grandes limitações. O uso clínico desses compostos ainda é inviável devido às dificuldades na administração, estabilidade, efeitos adversos deletérios ou ineficácia em ensaios clínicos em humanos (HERSHMAN *et al.*, 2014).

Portanto, embora muitos compostos tenham sido relatados como neuroprotetores até o momento, não há nenhum que previna ou reverta efetivamente a neurotoxicidade causada pela cisplatina (FERREIRA, 2017).

Assim, o estudo de possíveis compostos com atividade neuroprotetora é essencial para o desenvolvimento de novos fármacos para tratar este importante efeito adverso da quimioterapia.

1.5. Composto LDT 409

O Líquido da Casca da Castanha de Caju (LCC) é um subproduto de resíduos agrícolas da indústria de castanha de caju que é obtido a partir da planta *Anacardium occidentale* (BALACHANDRAN *et al.*, 2013; LOMONACO *et al.*, 2017).

Os constituintes químicos do LCC são compostos de origem fenólica, como o ácido anacárdico, cardanol, cardol e metilcardol (SAHIN, 2017). Esses compostos fenólicos possuem uma estrutura química única, aumentando assim sua relevância e possibilidades em aplicações comerciais e biológicas (SAHIN, 2017).

O Brasil é um dos principais produtores de caju no mundo, tendo o estado do Ceará como o maior produtor e exportador nacional, seguido pelo Piauí e Rio Grande do Norte (LOMONACO *et al.*, 2017). O *Anacardium occidentale* (cajueiro) tem sido descrito, há séculos, como uma valiosa planta medicinal, há relatos de aplicações como analgésico, diurético, líquido para higiene bucal, tratamento de sintomas respiratórios, infecções genitais, doenças de pele, dentre outras enfermidades (PAULINO, *et al.*, 2011).

Os ácidos anacárdicos são compostos fenólicos que possuem ampla bioatividade, como atividades antibacteriana, antioxidante, larvicida, inseticida e moluscicida (HAMAD E MUBOFU, 2015). Além disso, atuam na via colinérgica inibindo a acetilcolinesterase (HAMAD e MUBOFU, 2015; MORAIS *et al.*, 2017). Também foi descrita potente atividade inibidora da angiogênese de tumores, conduzindo a uma supressão significativa do crescimento do tumor da próstata (WU, 2011).

O LDT 409, representado na **Figura 2**, é uma molécula que foi sintetizada a partir do ácido anacárdico, isolado a partir do LCC, pelo professor Dr. Luiz Romeiro, do Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas da Universidade de Brasília. Inicialmente desenvolvido para ser testado como agonista de receptores PPAR, o LDT 409 é agonista parcial de PPAR α e PPAR γ e os resultados sugerem que ocorre ativação simultânea desses receptores em diversos tecidos, como adipócitos e hepatócitos (SAHIN, 2017). Além disso, o LDT 409 diminui a expressão de fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina 1 β (IL-1 β)

em camundongos com dieta rica em gordura, demonstrando atividade anti-inflamatória em modelo de obesidade (SAHIN, 2017).

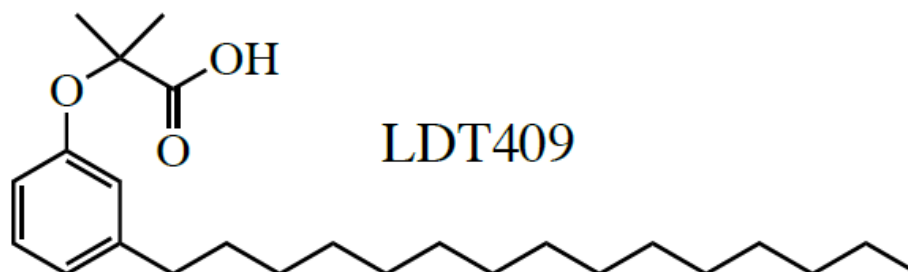


Figura 2: Estrutura molecular do LDT 409. Figura gentilmente cedida pelo professor Dr. Luiz Romeiro, da Universidade de Brasília.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a ativação dos receptores PPAR tem atividade anti-inflamatória em modelos de neurodegeneração (MOUTINHO e LANDRETH, 2017; ZOLEZZI *et al.*, 2017). Além disso, o LDT 409 tem atividade antioxidante em modelo *in vitro* de neurotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio em micróglia (dados ainda não publicados). Assim, neste trabalho será avaliada a potencial atividade neuroprotetora da molécula LDT 409 na neurotoxicidade induzida por cisplatina.

Desta forma, nossa hipótese é de que o LDT 409 tenha atividade neuroprotetora em modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.

2. JUSTIFICATIVA

Os efeitos adversos causados pelo uso de quimioterapia podem ser extremamente deletérios para o paciente, resultando no estabelecimento de neuropatia periférica e diminuição da qualidade de vida dos pacientes. Assim, diversos pesquisadores e clínicos tem proposto estratégias de tratamento e/ou prevenção da neuropatia periférica induzida por quimioterápicos, incluindo estratégias de neuroproteção. Desta forma, ao investigar a potencial atividade neuroprotetora da molécula LDT 409 em modelo *in vitro* de neurotoxicidade induzida por cisplatina este trabalho pode contribuir para o avanço do conhecimento na área e na bioprospecção de moléculas de interesse farmacológico, obtidas a partir de plantas brasileiras.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a potencial atividade neuroprotetora da molécula LDT 409 em modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.

3.2. Objetivos específicos:

- Determinar a dose tóxica de cisplatina em cultura de células PC12;
- Avaliar o efeito do LDT 409 na viabilidade de células PC12;
- Avaliar o efeito da cisplatina na expressão de RNAm da proteína GAP-43 em células PC12;
- Avaliar o efeito do LDT 409 na expressão de RNAm da proteína GAP-43 em células PC12 tratadas com cisplatina;
- Avaliar o efeito do LDT 409 na neuritogênese de células PC12 diferenciadas (com fenótipo neuronal).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Células PC12

Os mecanismos de neurotoxicidade podem ser estudados através de técnicas *in vitro* que são amplamente úteis. Vários modelos neuronais têm sido utilizados para detectar e caracterizar agentes neurotóxicos (DAS *et al.*, 2004). Lesões induzidas por agentes químicos em neurônios podem ser examinadas *in vitro* através da avaliação das alterações morfológicas na diferenciação e no crescimento dos neuritos (DAS *et al.*, 2004). Além disso, pode-se utilizar cultura primária de neurônios, bem como células imortalizadas.

As células PC12 são células imortalizadas, derivadas de feocromocitoma (GREENE e TISCHLER, 1976) que têm sido amplamente utilizadas em estudos neurobiológicos e neurotoxicológicos como modelo de diferenciação neuronal. Essas são células clonais que exibem as propriedades fenotípicas associadas a feocromocitomas e suas contrapartes não neoplásicas, células cromafins suprarrenais (GREENE e TISCHLER, 1976). Elas se diferenciam em células *neurônio-like* com estimulação do fator de crescimento do nervo (do inglês- Nerve Growth Factor - NGF), que gera uma grande mudança no fenótipo e o surgimento de uma série de propriedades bioquímicas e morfológicas características de neurônios (GREENE e TISCHLER, 1982). As células PC12 tratadas com NGF cessam a proliferação, prolongam os neuritos e tornam-se eletricamente excitáveis (GREENE e TISCHLER, 1982). Ferreira e colaboradores (2016) demonstraram que a cisplatina diminui o crescimento de neuritos em células PC12. Portanto, as células PC12 são uma ferramenta útil para estudar a ação de compostos com potencial neuroproteção na atividade neurotóxica da cisplatina através da avaliação da neuritogênese das células.

4.2. Cultura de Células

As células PC12 (*American Type Culture Collection* - ATCC® CRL -1721™) utilizadas neste trabalho foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro e gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Antônio Cardozo dos Santos da FCFRP-USP. As células foram mantidas em garrafas de 75 a 150 cm² a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂. O meio utilizado foi o RPMI 1640 acrescido de: 2,0 mM de L-glutamina; 1,5 g/L de bicarbonato de sódio; 4,5 g/L de glicose; 10,0 mM de HEPES; 1,0 mM de piruvato de sódio; 50000 UI./L de Penicilina; 0,86 mM de Streptomicina; Soro de Cavalo inativado por calor na concentração final de 10% e Soro fetal bovino (SFB) na concentração final de 5%. O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias e as células foram cultivadas por 3 ou 4 dias. Após esse período, as células foram desaderidas com tripsina 0,5% e semeadas em placas de 12 ou 24 poços.

4.2.1. Diferenciação Celular

Para os ensaios de neuritogênese as células PC12 foram diferenciadas em células *neurônio-like*. O meio de diferenciação utilizado foi o meio F12 suplementado com 1% de soro de cavalo inativado por calor, 1,0 mM de Piruvato de sódio, 50 µM/mL de penicilina e estreptomicina e 100 ng/mL de NGF por 24 horas.

O plaqueamento foi feito com meio RPMI 1640 por 24 horas em placas tratadas com colágeno IV para que ocorra a adesão das células diferenciadas aos poços das placas. Após esse período, as células foram diferenciadas por 24 ou 48 horas com o meio de diferenciação e foram consideradas diferenciadas, células que apresentaram pelo menos um neurito com comprimento igual ou maior que o diâmetro do corpo celular.

4.3. Viabilidade Celular

Para a análise da viabilidade celular foi utilizado o corante Azul de Tripano, que não atravessa as membranas celulares íntegras. Assim, as células vivas não permitem a passagem do corante e não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas tem suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul. A contagem das células viáveis foi realizada na câmara de Neubauer por experimentador cego quanto as variáveis do tratamento. Foram realizadas curvas concentração-resposta para o LDT 409 e cisplatina (24h de tratamento) para a determinação das concentrações tóxicas e não tóxicas para o LDT 409 e a cisplatina, que foram utilizadas nos experimentos de avaliação de neuritogênese. Aproximadamente 200 mil células foram semeadas em cada poço de uma placa de 24 poços.

4.4. Análise do Crescimento de neuritos

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços (400 mil células por poço), submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de LDT 409 e, de 2-4 campos de visão/poço diferentes foram fotografados 24h e 48h após os tratamentos. A análise morfológica foi realizada nas imagens obtidas através de microscópio de contraste de fase invertida (aumento de 400x) de forma cega quanto as variáveis. A quantificação foi realizada usando o *software* de imagem *Image J*®.

4.5. RT – PCRq (Reação da Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)

Primeiramente, o RNAm total das células PC12 foi extraído com o reagente

TRI Reagent® de acordo com instruções do fabricante. As células foram lavadas com 1 mL por poço de tampão fosfato salina 1X (phosphate buffered saline - PBS) a 37°C e o material genômico total foi extraído com 1 mL de TRI Reagent® para cada tratamento (1 mL de reagente para cada dois poços de uma placa de 12 poços) sob banho de gelo.

Para isolar o RNAm, foi utilizado o método de extração por clorofórmio-isopropanol. Foi adicionado em cada amostra 200 µL de clorofórmio, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após esse procedimento, a fase aquosa, que possui diluído o RNAt (RNA total), foi separada das demais fases. Essa fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 500 µL de isopropanol para que o RNAt possa se precipitar. Após a adição do isopropanol, a amostra foi homogeneizada, incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após essa centrifugação foi formado um *pellet*, ao qual foi adicionado 1 mL de etanol 75% para a lavagem do RNAt, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado e as amostras foram centrifugadas a 9.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após essa etapa, o etanol foi descartado e o *pellet* formado foi seco e diluído em água livre de ribonuclease (RNase).

Após a diluição em água livre de RNase, as amostras foram tratadas com a enzima desoxirribonuclease I (DNase 1) para garantir que as amostras estivessem livres de DNA genômico, que poderia interferir na análise pela RT-PCRq em tempo real. Esse tratamento foi realizado com o kit DNase – AMPD1®, conforme recomendações do fabricante. Desta forma, as amostras foram tratadas com 1 unidade/µL de DNase 1 para um volume final de 10 µL à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 µL de tampão de inativação (*Stop solution*) para inativação química da enzima e as amostras foram aquecidas a 70°C por 10 minutos em termociclador (Biorad, Hercules, CA, EUA) para possibilitar a inativação física da DNase. Foi utilizado o espectrofotômetro (NanoVue Plus – GE Health, Life Sciences, Buckinghamshire, UK) para determinar a concentração de RNAt presente em cada amostra.

Os *primers* empregados nos ensaios de RT – PCRq realizados neste trabalho, já haviam sido validados nas células PC12 pelo nosso grupo. As sequências de pares de base podem ser observadas no **Quadro 1**.

Quadro 1 - Relação dos pares de base de cada *primer*

Gene	Sequência	PB	Referência
β-actina	F: 5' -AGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'	20	Z. Y. Li <i>et al.</i> , 2016
	R: 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'	20	
GAP-43	F: 5' -AAGGCAGGGGAAGATACCAC-3'	20	Z. Liu <i>et al.</i> , 2015
	R: 5' -TTGTTCAATCTTTTGGTCCTCAT-3'	23	

Para a análise da expressão gênica da proteína GAP-43 (utilizada como marcador de crescimento neuronal) nas células tratadas com LTD 409 e/ou cisplatina, foi utilizado o kit Power SYBR® Green RNA-to-CT 1-Step (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) conforme instruções do fabricante. A partir desse método, pode-se quantificar a amplificação do gene de interesse através da quantidade de luz emitida pelo corante SYBR® Green I, pois o fluoróforo tem a capacidade de se intercalar entre as fitas duplas de DNA e por consequência emitir fluorescência. Mediante ao aumento do produto formado, as intercalações do corante são maiores e, por conseguinte, ocorre uma emissão maior na quantidade de luz, sendo que esse sinal luminoso é convertido para a forma numérica e representado pelo *Cycle threshold* (Ct – Ciclo limiar, em tradução livre), ou seja, o número de ciclos necessários para que a amplificação se torne exponencial.

As reações de amplificação foram realizadas em placas de MicroAmp® de 96 poços, livres de DNA, RNA e RNase, com volume de 0,1 mL. Para tal, cada reação possuía volume final de 10 μ L, sendo 5,5 μ L de mix da reação e 4,5 μ L de amostra, o volume foi completado com água livre de RNase (**Quadro 2**). A água foi usada como controle negativo dos experimentos em substituição da amostra e os demais componentes presentes nas reações foram mantidos.

Quadro 2 - Reagentes utilizados por reação nos experimentos de RT-PCRq

Reagentes	Volume
Mix <i>Power SYBR® Green</i> RT-PCR (2X)	5,00 µL
<i>Forward primer</i> (100 µM)	0,20 µL
<i>Reverse primer</i> (100 µM)	0,20 µL
Mix da Enzima Transcriptase Reversa (125X)	0,08 µL
RNAm (10 ng)	4,50 µL
Água livre de RNase	0,02 µL
Volume Final	10,00 µL

A mensuração dos valores foi realizada pelo equipamento *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* modelo AB7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para isso, as amostras foram submetidas ao programa de transcrição reversa (48°C por 30 minutos), ativação da Taq DNA polimerase: (95°C por 10 minutos), 40 ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação (95°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por 1 minuto para o anelamento e extensão). Os dados obtidos foram analisados no *Software StepOne* versão 2.1.

Além disso, foi realizada a curva de *melting*, que consiste em uma curva de dissociação em que as amostras são aquecidas a 60°C e submetidas a aumentos graduais de temperatura (acréscimos de 0,3° C) até a temperatura de 95°C. O objetivo dessa curva é observar se ocorre amplificação de outros produtos ou formação de dímeros de *primers*. A temperatura de dissociação (T_m - +/-) determina o momento em que o produto de PCR (*amplicon*) apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples, sendo que cada *amplicon* possui uma T_m própria. Dessa forma, se a amostra apresentar apenas um pico de decaimento, há apenas a formação de um *amplicon*. 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, obtido pelo *Software*.

As determinações da expressão gênica foram feitas no equipamento *StepOnePlus* modelo AB7500 e os dados obtidos foram obtidos pelo programa *Software StepOne* versão 2.1. A expressão gênica da β -actina foi utilizada como o controle interno dos experimentos, dessa forma, o Cts de GAP-43 das amostras

foram subtraídos dos Cts da β -actina (Δ Ct). A expressão relativa dos genes foi realizada utilizando o método de comparação do Ct ou $\Delta\Delta$ Ct. Dessa maneira, a expressão relativa do gene corresponderá ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct amostras} - \Delta\text{Ct calibrador}$, sendo o calibrador a amostra tratada com veículo (LIVAK, 2001).

4.6. Análise Estatística

Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes em culturas independentes. Os resultados foram apresentados como média do $n \pm$ erro padrão média (standard error of the mean – SEM) e foram analisados através do programa *Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, CA). Para resultados cuja distribuição dos valores das amostras foi não paramétrica, as diferenças das médias entre os grupos foram analisadas pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do pós teste de Dunns. Amostras cuja distribuição dos valores foi paramétrica, as diferenças das médias entre os grupos foram analisadas pelo teste ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni. $p < 0,05$ Foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da concentração tóxica de cisplatina em cultura de células PC12

Para determinar a concentração tóxica de cisplatina em células PC12, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, no qual as células foram tratadas por 24h com as concentrações de 50 μM , 150 μM e 450 μM de cisplatina, assim como o controle negativo (PBS 1X) e posteriormente foi feita a contagem das células para a determinação da viabilidade (**Figura 3**). De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com a concentração de 50 μM apresentou viabilidade celular de 88,18%, a de 150 μM foi de 50,46% e a de 450 μM foi de 18,40%. A partir destes resultados a concentração tóxica de cisplatina escolhida para ser utilizada foi a de 150 μM , já que a viabilidade celular foi inferior a 70%, conforme observado na **Figura 4**.

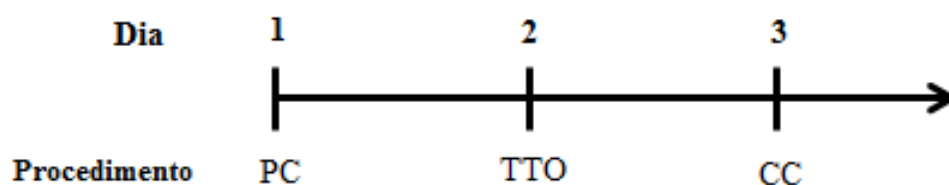


Figura 3: Delineamento experimental – Toxicidade cisplatina. PC: plaqueamento celular, TTO: tratamento das células com cisplatina, CC: coleta e contagem das células.

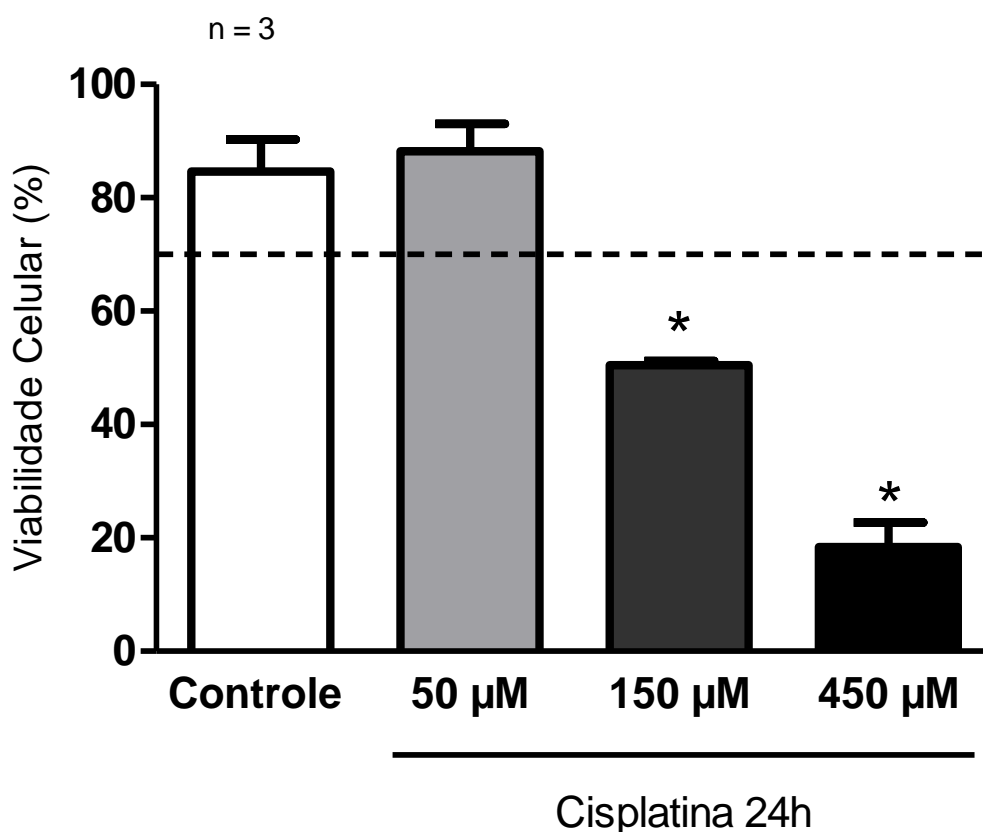


Figura 4: Viabilidade celular de células PC12 tratadas com cisplatina. As células foram tratadas por 24h nas concentrações descritas. Controle (PBS). * diferença estatisticamente significativa do controle. ($p < 0,05$).

5.2. Efeito do LDT 409 na viabilidade celular

Antes de determinar o efeito neuroprotetor do LDT 409, foi necessário verificar se o composto por si só apresenta neurotoxicidade. Para isso, as células PC12 foram plaqueadas e tratadas por 24h com as concentrações de 3 µM, 9 µM e 27 µM de LDT 409, assim como os controles negativo (veículo – DMSO 0,033%) e positivo (concentração tóxica de cisplatina – 150 µM), conforme descrito na **Figura 5**. As concentrações de LDT 409 foram determinadas baseadas em estudos anteriores nos quais o composto não foi citotóxico até a concentração de 50 µM e demonstrou atividade a partir da concentração de 10 µM (SAHIN, 2017). Posteriormente foi feita a contagem das células para a determinação da viabilidade com azul de tripano. Conforme observado na **Figura 6**, o LDT 409 não demonstrou

citotoxicidade por não diminuir significativamente a viabilidade celular nas concentrações testadas.

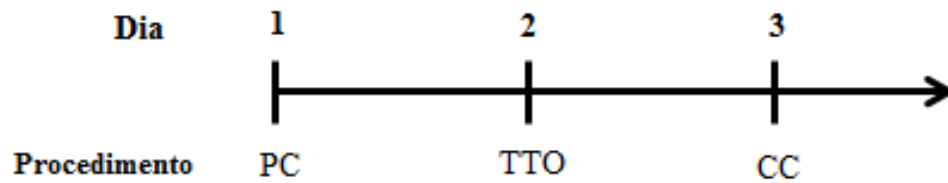


Figura 5: Delineamento experimental – Viabilidade celular LDT 409. PC: plaqueamento celular, TTO: tratamento das células com LDT 409 ou Cisplatina, CC: coleta e contagem das células.

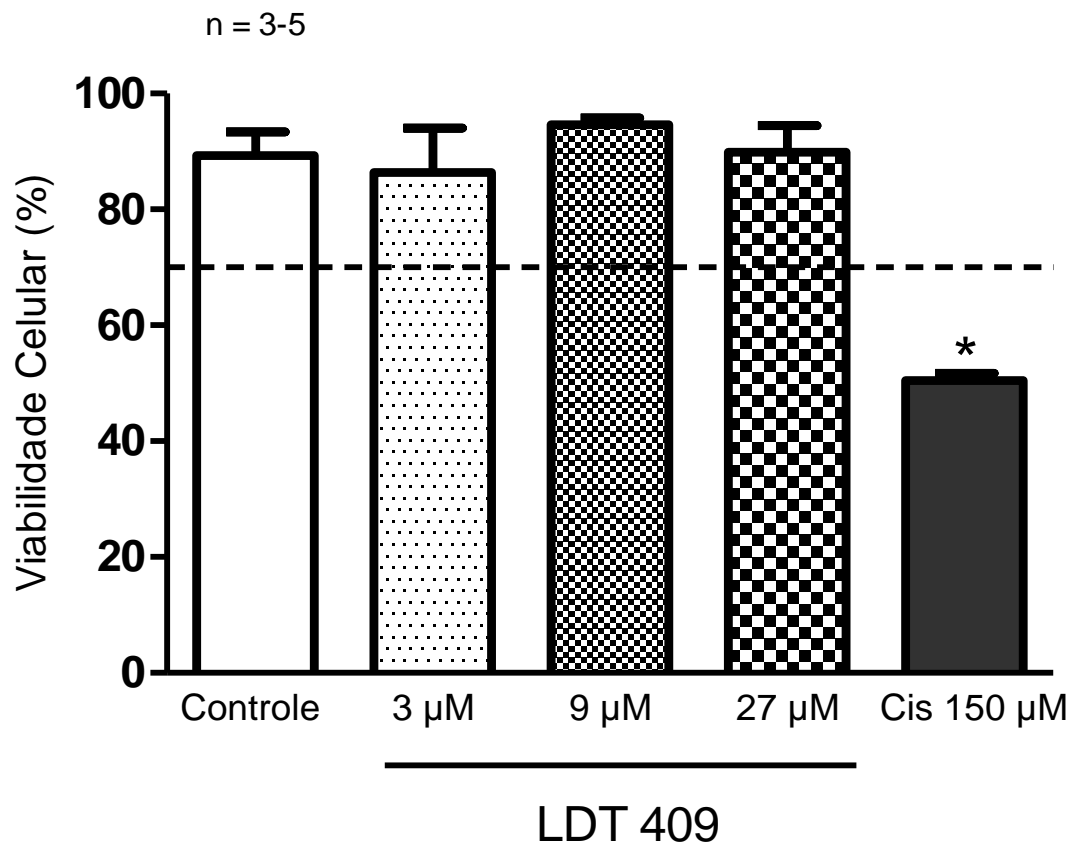


Figura 6: Viabilidade celular de células PC12 tratadas com LDT 409 ou cisplatina. As células foram tratadas por 24h nas concentrações descritas. Controle (DMSO 0,033%). * $p < 0,05$ vs Controle.

5.3. Análise do efeito da cisplatina na expressão de RNAm da proteína GAP-43 em células PC12

Uma vez determinada a concentração tóxica de cisplatina em células PC12, foi avaliado qual seu efeito na expressão de RNAm da GAP-43, que é uma proteína utilizada como marcador de plasticidade neuronal. Dessa forma, foi quantificada a expressão gênica relativa de GAP-43 em células PC12 tratadas com cisplatina por 24h em duas concentrações diferentes (50 e 150 μM). Na **Figura 7**, é possível observar que a concentração de 50 μM diminuiu a expressão gênica relativa de GAP-43 em 40,92% quando comparada ao controle. Entretanto, a maior concentração não promoveu alteração da expressão gênica de GAP-43 em relação ao controle.

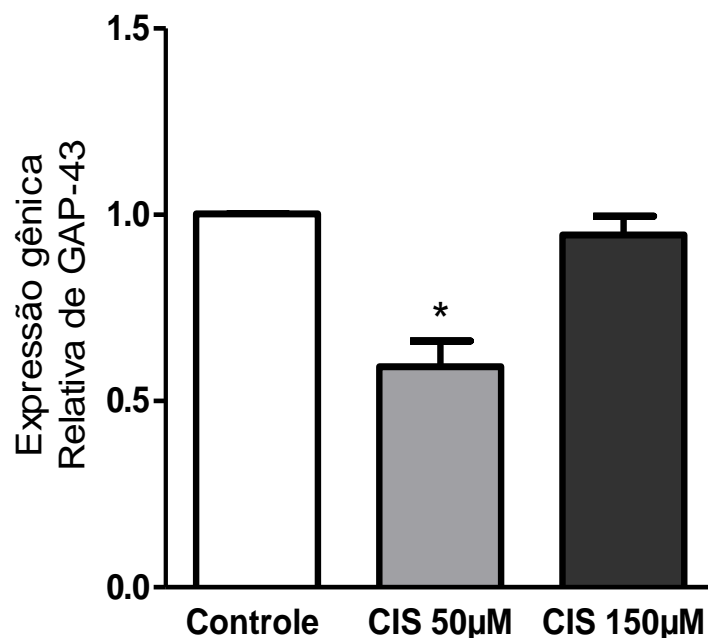


Figura 7: Expressão gênica relativa de GAP-43. Efeito na expressão de RNAm da proteína GAP-43 em células PC12 após 24h de tratamento com 50 e 150 μM de cisplatina. O material genômico foi extraído com Tri reagent® e a quantificação de GAP-43 foi avaliada pelo ensaio de RT-PCRq em tempo real e normalizada pelos valores de β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle. ns: não significativo SEM. * $p < 0,05$ vs Controle.

5.4. Análise do efeito do LDT 409 na expressão de RNAm da proteína GAP-43 em células PC12 tratadas com cisplatina

Após avaliar o efeito da cisplatina na expressão de RNAm de GAP-43, foram realizados ensaios para verificar o efeito do LDT na expressão gênica da GAP-43 em células tratadas com cisplatina (50 ou 150 μM). Para isso, as células foram co-tratadas com cisplatina e LDT 409 (3, 9 e 27 μM) 24 horas. Após os tratamentos, o material genético das células foi coletado para posterior quantificação do RNAm de GAP-43 através dos ensaios de RT-PCRq em tempo real (**Figura 8**).

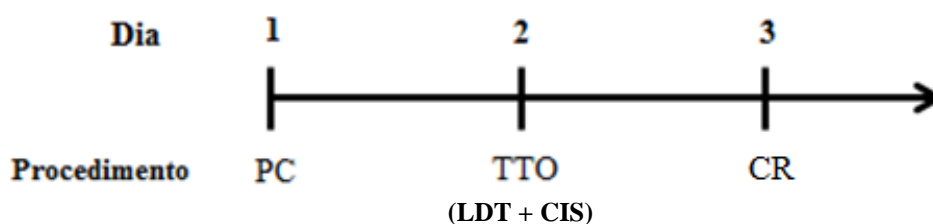


Figura 8: Delineamento experimental – LDT 409 na expressão do RNAm de GAP-43. PC: plaqueamento celular, TTO: tratamento das células com LDT 409 e cisplatina, CR: coleta de RNAt após 24h de tratamento.

De acordo com a **Figura 9 A**, não houve diferença significativa entre as células tratadas somente com LDT 409 em relação ao controle, a expressão gênica de GAP-43 foi reduzida em 40,92% quando as células foram tratadas somente com cisplatina (50 μM) quando comparado com o controle. Entretanto, o LDT não foi capaz de modular as alterações induzidas pela cisplatina em nenhuma das concentrações testadas.

Os dados da **Figura 9 B** demonstram que não houve diferença significativa entre as células tratadas somente com LDT 409 em relação ao controle. O tratamento com 150 μM de cisplatina também não alterou a expressão de GAP-43. Os dados também demonstram que houve aumento de 14,74% da expressão de RNAm de GAP-43 nas células tratadas com LDT 409 na presença de cisplatina, nas concentrações de 9 μM e um aumento de 16,51% na concentração de 27 μM .

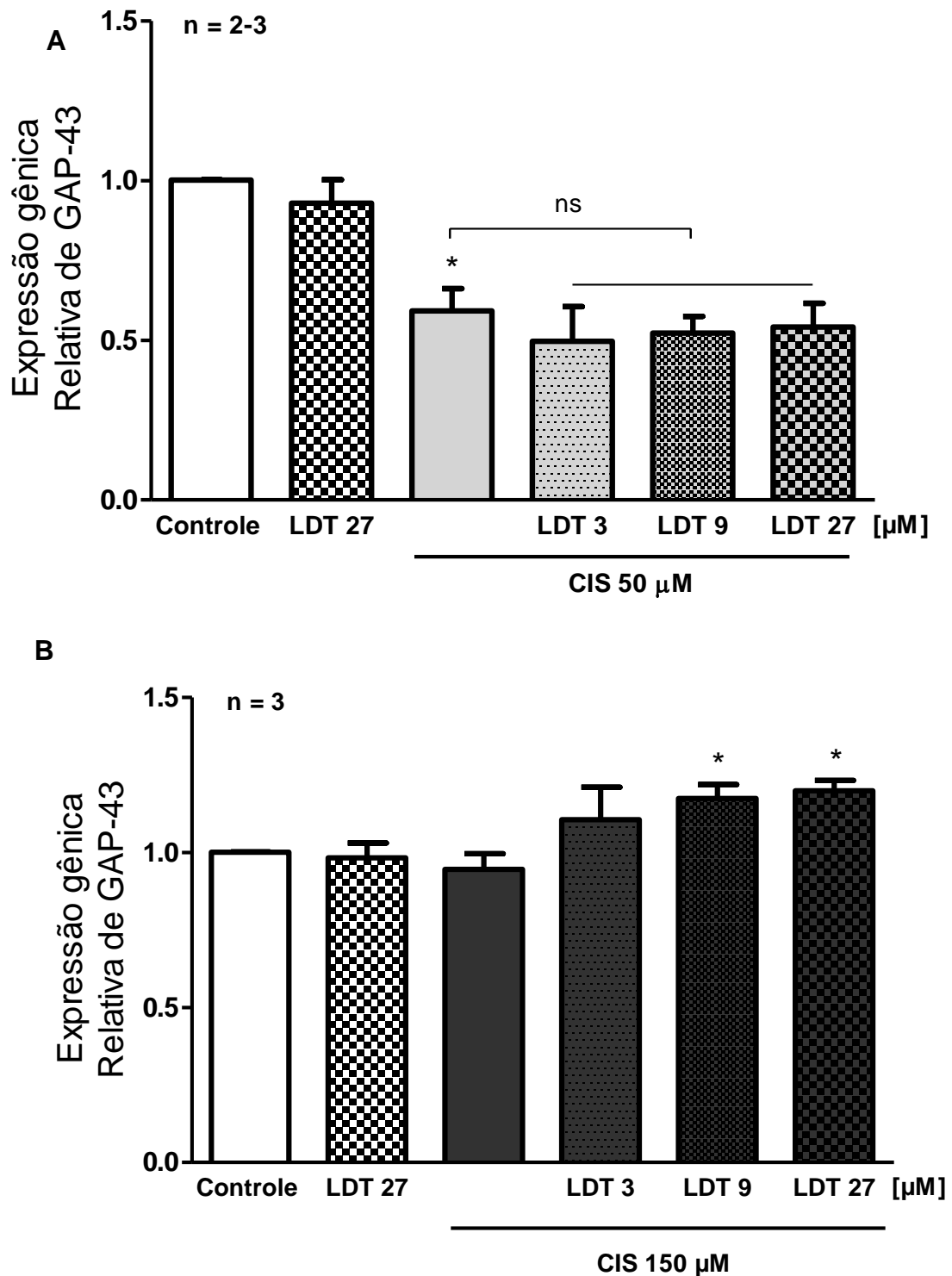


Figura 9: Expressão do RNAm de GAP-43 em células PC12 tratadas com cisplatina. **(A)** Expressão gênica relativa de GAP-43. Efeito da cisplatina e do LDT na expressão de RNAm da proteína GAP-43 em células PC12 após 24h de tratamento. O material genômico foi extraído com Tri reagent® e a quantificação de GAP-43 foi avaliada pelo ensaio de RT-PCRq em tempo real e normalizada pelos valores de β -actina. * $p < 0,05$ em relação A CIS 50 μM. ns: não significativo. **(B)** Expressão gênica relativa de GAP-43. Efeito na expressão de RNAm da proteína GAP-43 em células PC12 após 24h de tratamento com LDT 409 e concentração tóxica de cisplatina. O material genômico foi extraído com Tri reagent® e a quantificação de GAP-43 foi avaliada pelo ensaio de RT-PCRq em tempo real e normalizada pelos valores de β -actina. * $p < 0,05$ em relação à CIS 150 μM. ns: não significativo.

A **Figura 10** e **Figura 11** mostram a morfologia das células PC12 após 24h de cada tratamento empregado. É possível observar que as células tratadas com 150 μM de cisplatina tem a estrutura fortemente distinta quando comparadas com o controle ou com as células tratadas somente com LDT 409.

As células tratadas somente com LDT 409 **Figuras 10 B e 11 B** apresentaram morfologia semelhante ao controle **Figuras 10 A e 11 A**. Quando tratadas com cisplatina (150 μM), as células sofreram alterações morfológicas evidentes, tiveram aumento no tamanho nuclear e celular e núcleo com coloração mais escura **Figuras 10 C e 11 C**. Os grupos que apresentaram maiores alterações morfológicas quando comparados ao controle, foram os tratados somente com cisplatina (150 μM) e os tratados com cisplatina e 3 μM de LDT 409 **Figuras 10 D e 11 D**. As células tratadas com 9 e 27 μM de LDT 409 juntamente com a cisplatina, também diferem morfológicamente do controle por estarem visivelmente arredondadas **Figuras 10 E, F e 11 E, F**, mas a diferença no tamanho das células e do núcleo é menos pronunciada quando comparado às células tratadas somente com cisplatina e às células co-tratadas com cisplatina e LDT409 (3 μM).

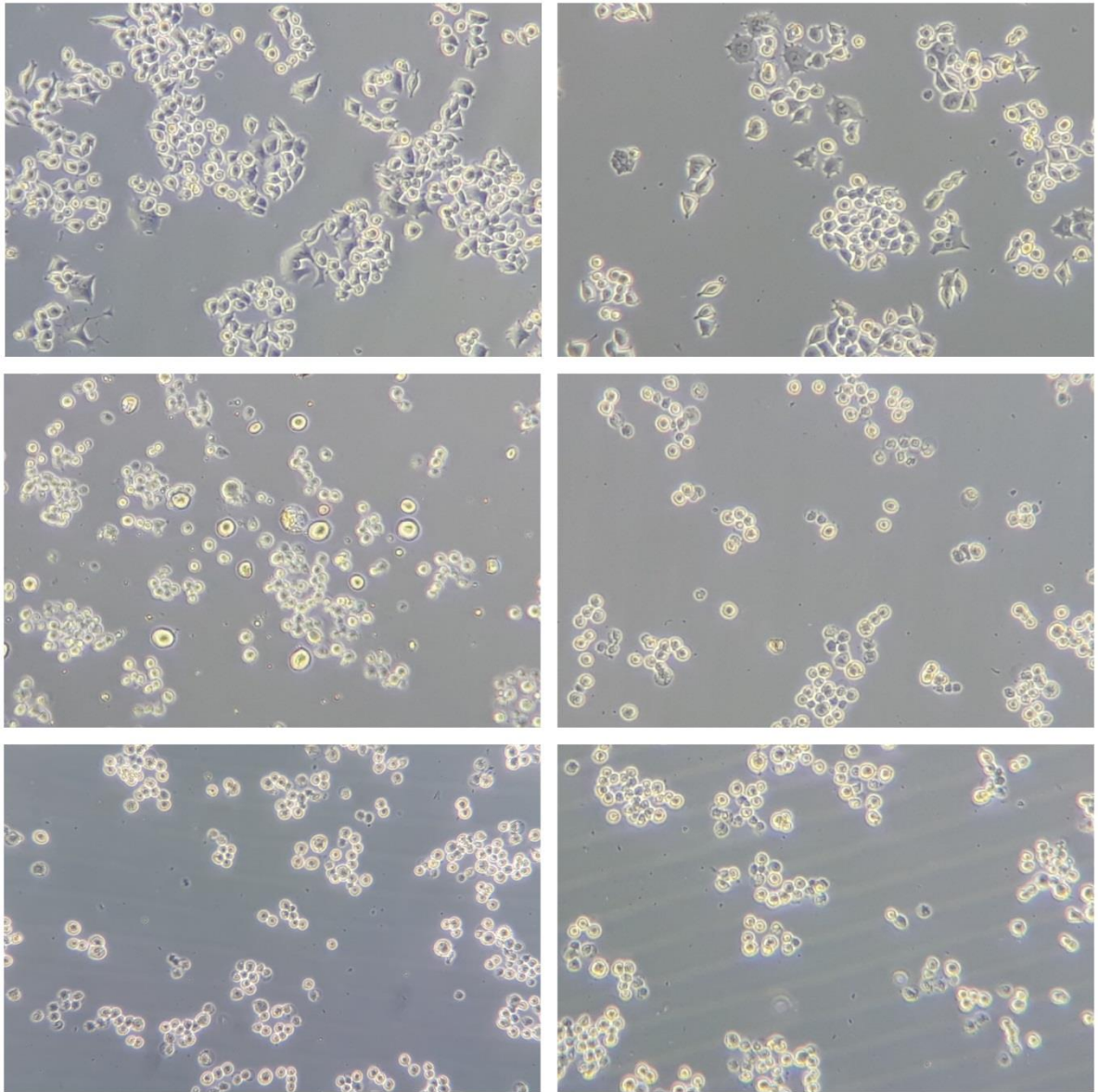


Figura 10: Morfologia das células PC12 tratadas com LDT e/ou cisplatina. As fotografias representam as células após 24h de cada tratamento. As imagens foram obtidas através de microscópio de contraste de fase invertida (aumento de 200×). **(A)** Controle: diluente LDT 409 (DMSO: 0,033%). **(B)** LDT 409: 27μM. **(C)** Cisplatina 150 μM. **(D)** Cisplatina 150 μM + LDT 409 3 μM. **(E)** Cisplatina 150 μM + LDT 409 9 μM. **(F)** Cisplatina 150 μM + LDT 409 27 μM. Imagens feitas pelo autor.

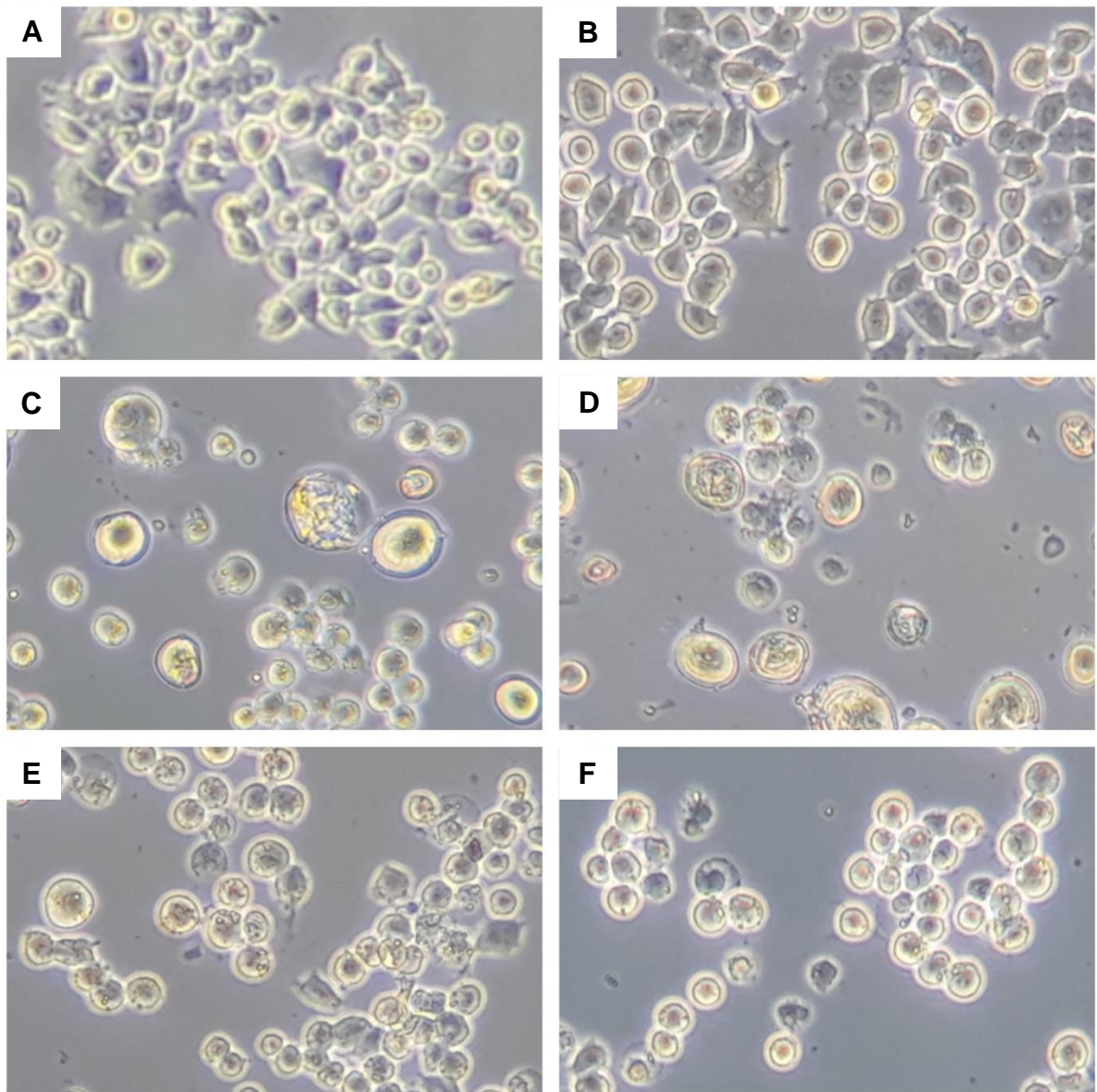


Figura 11: Morfologia das células PC12 tratadas com LDT e/ou cisplatina. As fotografias representam as células após 24h de cada tratamento. As imagens foram obtidas através de microscópio de contraste de fase invertida (aumento de 400×). **(A)** Controle: diluente LDT 409 (DMSO: 0,033%). **(B)** LDT 409: 27μM. **(C)** Cisplatina 150 μM. **(D)** Cisplatina 150 μM + LDT 409 3 μM. **(E)** Cisplatina 150 μM + LDT 409 9 μM. **(F)** Cisplatina 150 μM + LDT 409 27 μM. Imagens feitas pelo autor.

5.5. Avaliação do efeito do LDT 409 na neuritogênese de células PC12 diferenciadas

As células PC12 foram tratadas com LDT 409 para a avaliação da sua atividade na neuritogênese. Para tanto, foi analisado efeito do composto no processo de neuritogênese após 24 e 48h de tratamento (**Figura 12**). O semeio das células foi realizado em placas tratadas com colágeno IV para melhorar a adesão celular e a diferenciação em células *neurônio-like* ocorreu com a utilização do meio de diferenciação. A neuritogênese foi avaliada através da quantificação das células que apresentaram pelo menos um neurito com comprimento igual ou maior que o diâmetro do corpo celular utilizando o *Software ImageJ*®.

De acordo com os resultados obtidos, as concentrações de LDT 409 (3, 9 e 27 μ M) não foram capazes de alterar a quantidade de células P2C12 diferenciadas (**Figura 13**), tampouco o comprimento de neuritos (**Figura 14**) após 24h ou 48h de tratamento em relação ao controle. Portanto, o LDT 409 não teve efeito sob a neuritogênese de células PC12.



Figura 12: Delineamento experimental – Neuritogênese em células PC12 tratadas com LDT 409. TP: tratamento da placa de 12 poços com colágeno IV, PC: plaqueamento celular em meio completo, MD: troca do meio para o meio de diferenciação, TTO: tratamento das células com diferentes concentrações de LDT 409, F24h: fotografias dos poços após 24h de tratamento, F48h: fotografias dos poços após 48h de tratamento.

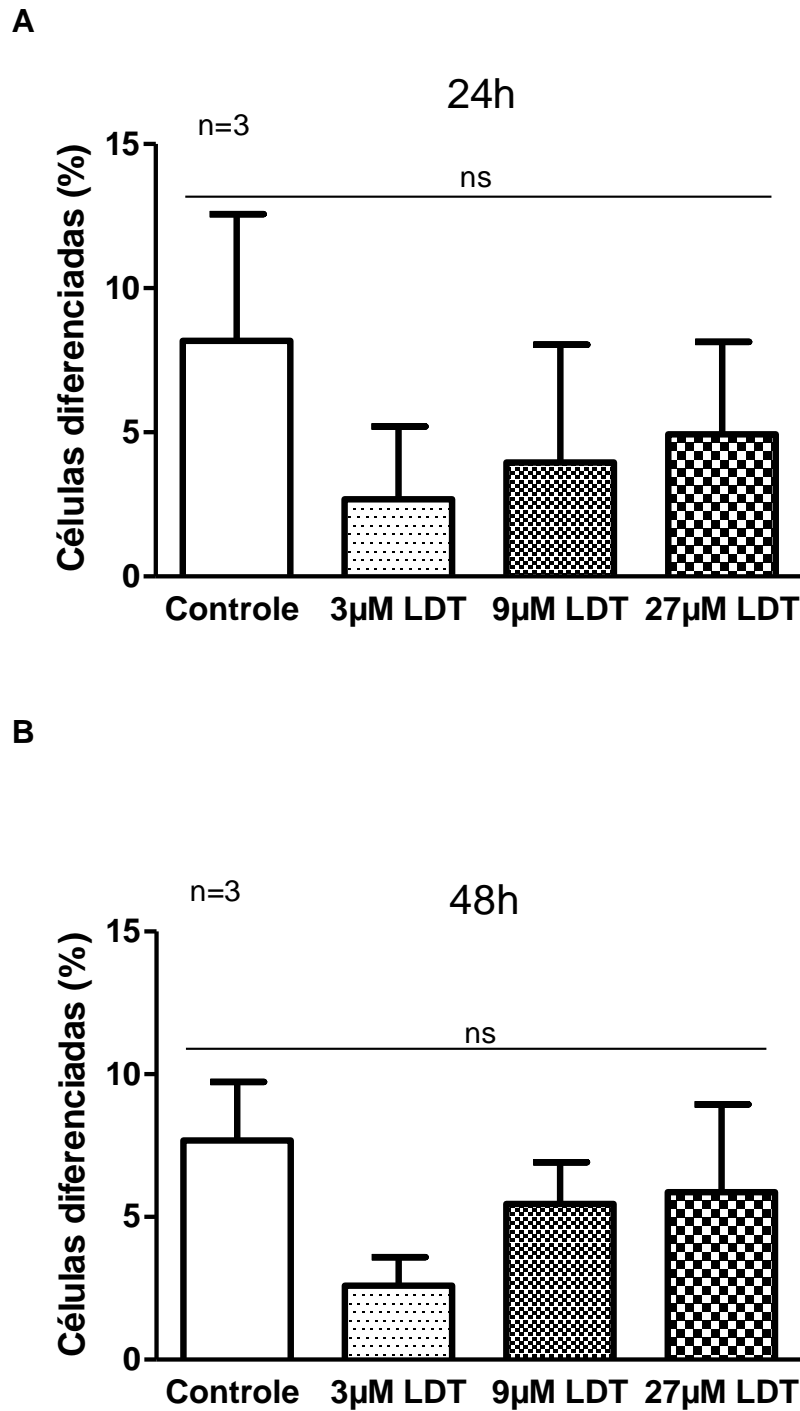


Figura 13: Porcentagem de células diferenciadas após tratamento com LDT 409. **(A)** 24h de tratamento. **(B)** 48h de tratamento. Controle: DMSO 0,033%. ns: não significativo. * $p < 0,05$.

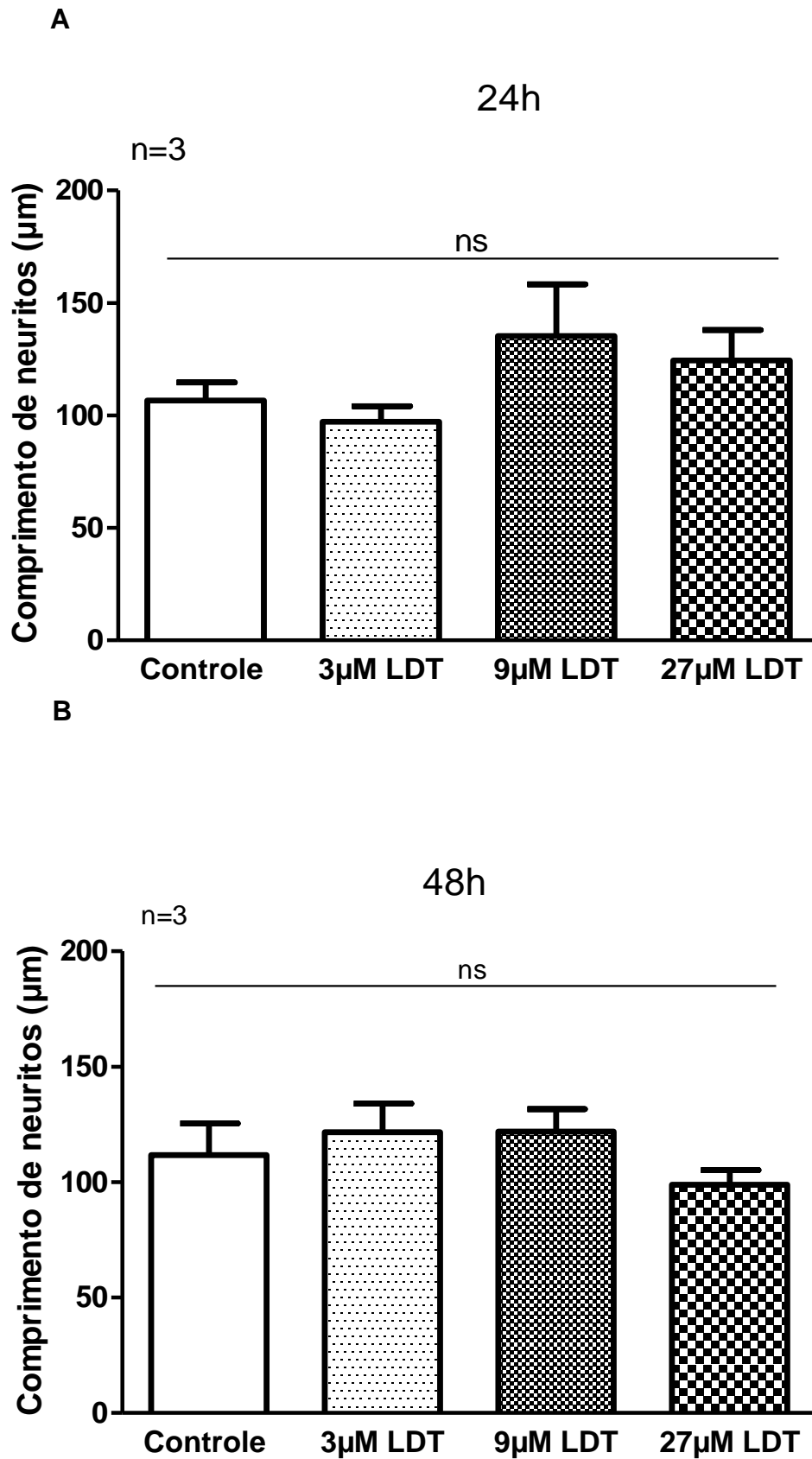


Figura 14: Comprimento dos neuritos de células PC12 após tratamento com LDT 409. **(A)** 24h de tratamento. **(B)** 48h de tratamento. Controle: DMSO 0,033%. ns: não significativo.

6. DISCUSSÃO

A NPIQ além de diminuir a qualidade de vida dos pacientes, também pode limitar o tratamento quimioterápico (CAROZZI *et. al.*, 2016). Desta forma, tem sido propostas diversas abordagens para tratamento e/ou prevenção da NPQI, incluindo estratégias de neuroproteção. Deste modo, explorar a vasta biodiversidade brasileira em busca de tratamentos neuroprotetores é uma boa alternativa. O Brasil é um dos principais produtores de caju no mundo e o cajueiro tem sido descrito, há séculos, como uma valiosa planta medicinal. Portanto, o estudo da bioatividade de moléculas isoladas de plantas brasileiras, que servem de base para a síntese de novos compostos como o LDT 409 pode contribuir para o avanço na pesquisa de novos compostos neuroprotetores para o tratamento da NPIQ.

De acordo com a ISO 10993-5 de 2009, um composto é considerado citotóxico quando gera uma redução na viabilidade celular superior a 30%. Com os resultados obtidos, observa-se que a concentração tóxica de cisplatina foi de 150 μM , já que a viabilidade celular foi inferior a 70%. Mendonça e colaboradores (2013) também relataram a diminuição da viabilidade celular em células PC12 tratadas por 24h com cisplatina, entretanto, a cisplatina teve efeito citotóxico a partir da concentração de 10 μM . De acordo com os resultados obtidos, a cisplatina apenas se mostrou citotóxica em 24h na concentração de 150 μM . Essa diferença pode ter ocorrido devido ao ensaio aplicado para avaliar a viabilidade celular, uma vez que foi empregado o método de azul de tripano, que cora somente as células que estão mortas devido à permeabilidade de suas membranas danificadas, já as células viáveis não são coradas, o corante não as permeia por possuírem membranas íntegras. Diferentemente, Mendonça e colaboradores (2013) avaliaram a viabilidade utilizando a técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). O MTT avalia a atividade da enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase, e é sabido que a cisplatina interfere diretamente na função das mitocôndrias (CAROZZI *et. al.*, 2016). Assim, a cisplatina pode causar dano mitocondrial antes mesmo de causar morte celular, observada no ensaio de azul tripano.

Uma vez determinada a concentração de cisplatina que promovia redução

da viabilidade celular, o próximo passo foi avaliar a capacidade neuroprotetora do LDT 409. Porém, foi avaliado antes, se o composto *per se* seria citotóxico. Dessa forma, nos ensaios de viabilidade o LDT 409 não demonstrou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas (3, 9 e 27 μM).

Em seguida avaliamos a expressão gênica de GAP-43, um marcador de neuroplasticidade. Em nossos estudos, observamos a diminuição da expressão relativa de RNAm de GAP-43 em células tratadas com 50 μM de cisplatina por 24h. Corroborando esse resultado, foi observado no estudo de Ferreira e colaboradores (2016) que a cisplatina causa diminuição da expressão da GAP-43 e outras proteínas relacionadas à neuroplasticidade em células PC12, mesmo em concentrações baixas (5 μM). Takeshita e colaboradores (2019) observaram efeito semelhante na diminuição de expressão gênica de GAP-43 em células PC12 tratadas com oxaliplatina na concentração de 0,5 μM por 24h, um fármaco da mesma classe da cisplatina que também induz NP. Mesmo que essa concentração de cisplatina não tenha reduzido a viabilidade celular, é importante ressaltar que a cisplatina causa outros danos neuronais (em GRD), como indução de estresse oxidativo e dano ao DNA nuclear e mitocondrial, então avaliar a neurotoxicidade através de outros parâmetros como os marcadores de neuroplasticidade é importante.

Além disso, verificamos a expressão gênica de GAP-43 com a concentração de 150 μM de cisplatina. Surpreendentemente, o tratamento com cisplatina na concentração de 150 μM por 24h não promoveu alteração da expressão gênica de GAP-43 quando comparada ao controle. O resultado esperado seria a diminuição da expressão do RNAm de GAP-43 no tratamento com a maior concentração de cisplatina (150 μM). No momento, não encontramos dados na literatura que possam explicar este fenômeno, serão necessários mais experimentos para avaliar porque doses maiores de cisplatina não induziram alteração na expressão de GAP-43.

Verificamos então se o LDT seria capaz de prevenir o efeito da cisplatina (50 μM) na expressão gênica de GAP-43 e observamos que em nenhuma das concentrações avaliadas o LDT 409 preveniu a diminuição da expressão de RNAm de GAP-43.

Diferentemente, a concentração de 150 μM de cisplatina não induziu modulação da expressão gênica de GAP-43 e os co-tratamentos com LDT 409 nas concentrações de 9 e 27 μM aumentaram a expressão relativa desse gene quando

comparados às células tratadas somente com cisplatina 150 μM . Entretanto, com base neste último resultado não é possível considerar que o LDT 409 apresentou atividade neuroprotetora, já que as células tratadas com 150 μM de cisplatina não tiveram expressão gênica diferente do controle.

No decorrer do trabalho, ao realizar o tratamento das células com cisplatina observamos nitidamente que a concentração de 50 μM não induzia alterações morfológicas. Entretanto, a concentração de 150 μM de cisplatina produzia notáveis alterações morfológicas quando comparadas ao controle ou às células tratadas somente com LDT 409. As principais alterações foram o tamanho celular e nuclear aumentado e o formato esférico das células. Ferreira e colaboradores (2016) descreveram alterações morfológicas semelhantes em células PC12 tratadas com uma menor concentração de cisplatina (5 μM). Cabe ressaltar que o descrito tratamento com cisplatina (5 μM) foi realizado por 72h.

A neuritogênese pode ser considerada como um fator preditivo de neuroplasticidade, portanto moléculas capazes de induzir este processo tem potencial neuroprotetor. Assim, testamos a hipótese de que o LDT 409 tivesse atividade neuritogênica. Contudo, nas concentrações testadas (3, 9 e 27 μM) o LDT não alterou o crescimento de neuritos. Os dados obtidos sugerem que o LDT 409 não possui efeito neuroprotetor no modelo testado.

A hipótese inicial do trabalho foi a de que o LDT 409 tinha atividade neuroprotetora, uma vez que estudos de nossos colaboradores mostraram que este composto ativa os receptores PPAR α e PPAR γ e diminui a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Como a cisplatina sabidamente causa aumento de citocinas e de espécies reativas de oxigênio e os receptores PPAR interferem nestas vias de sinalização, seria plausível que uma molécula ativadora de PPAR pudesse diminuir estes efeitos e, conseqüentemente, ter atividade neuroprotetora. Muito embora nossos resultados não tenham demonstrado efeito sobre a neuritogênese, seria interessante avaliar o efeito do LDT 409 sobre a liberação de espécies reativas de oxigênio. Outro ponto importante seria avaliar se o LDT 409 previne a diminuição da neuritogênese induzida pela cisplatina. Mesmo considerando que esta molécula sozinha não induz crescimento de neuritos, seria possível interferir nos efeitos da cisplatina. Também poderia ser avaliada a expressão da proteína GAP-43 que poderia ser diferente de sua expressão gênica. Ainda, uma limitação do nosso estudo é que não avaliamos o efeito do LDT 409 na diminuição da viabilidade celular

causada pela cisplatina. Este efeito não foi inicialmente considerado, no entanto, será objeto de futuros estudos.

7. CONCLUSÃO

O estudo da atividade de biomoléculas sintetizadas a partir compostos isolados de plantas brasileiras, como o LDT 409 para fins terapêuticos possui relevância ecológica e econômica por ser um composto obtido através da reutilização de resíduos agrícolas. Este trabalho pode contribuir nos estudos de atividade de novas moléculas para tratar efeitos adversos de drogas quimioterápicas. Entretanto, de acordo com os ensaios realizados, o LDT 409 não demonstrou efeito neuroprotetor em modelo de neurotoxicidade *in vitro* induzido por cisplatina em células PC12.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D. T.; KIERNAN, J. A. Permeation of proteins from the blood into peripheral nerves and ganglia. *Neuroscience*, v. 59, n. 3, p. 755-764, 1994.

BALACHANDRAN, V. S. *et al.* Recent advances in cardanol chemistry in a nutshell: from a nut to nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 2, p. 427-438, 2013.

BENOWITZ, L. I.; ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in neurosciences*, v. 20, n. 2, p. 84-91, 1997.

CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: what do we know about mechanisms?. *Neuroscience letters*, v. 596, p. 90-107, 2015.

CAVALETTI, G. *et al.* Cisplatin-Induced peripheral neurotoxicity is dependent on total-dose intensity and single-dose intensity. *Cancer*, v. 69, n. 1, p. 203-207, 1992.

DAS, K. P.; FREUDENRICH, T. M.; MUNDY, William R. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicology and teratology*, v. 26, n. 3, p. 397-406, 2004.

DE AFONSECA, S. O.; DA COSTA SILVA, M. A.; DEL GIGLIO, A. Abordagem da neuropatia periférica induzida por quimioterapia. *Revista Brasileira de Medicina*. São Paulo, v. 67, p. 20-25, 2010.

DENNY, J. B. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. *Current neuropharmacology*, v. 4, n. 4, p. 293-304, 2006.

DWORKIN, R. H. *et al.* Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. In: *Mayo Clinic Proceedings*.

Elsevier, p. S3-S14, 2010.

ELJACK, N. D., *et al.* Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. *Metallomics*. 2014.

FERREIRA, R. S. *et al.* Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Protects PC12 Cells from Cisplatin-Induced Neurotoxicity by Activating the NGF-Signaling Pathway. *Neurotoxicity research*, p. 1-15, 2017.

FERREIRA, R. S. *et al.* Non-cytotoxic concentration of cisplatin decreases neuroplasticity-related proteins and neurite outgrowth without affecting the expression of NGF in PC12 cells. *Neurochemical research*, v. 41, n. 11, p. 2993-3003, 2016.

FLORES, M. P.; DE CASTRO, A. P. C. R.; NASCIMENTO, J. D. S. Analgésicos tópicos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, p. 244-252, 2012.

GORGUN, M. F.; ZHUO, M.; ENGLANDER, E. W. Cisplatin toxicity in dorsal root ganglion neurons is relieved by meclizine via diminution of mitochondrial compromise and improved clearance of DNA damage. *Molecular neurobiology*, v. 54, n. 10, p. 7883-7895, 2017.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 73, n. 7, p. 2424-2428, 1976.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. In: *Advances in cellular neurobiology*. Elsevier, 1982. p. 373-414.

HAMAD, F. B.; MUBOFU, E. B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 4, p. 8569-8590, 2015.

HAUSHEER, F. H. *et al.* Diagnosis, management, and evaluation of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Elsevier. In *Seminars in oncology*. Vol. 33, No. 1, pp. 15-49, 2006.

HENNEMANN-KRAUSE, L.; SREDNI, S. Systemic drug therapy for neuropathic pain. *Revista Dor*, v. 17, p. 91-94, 2016.

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. *Journal of Clinical Oncology*, v. 32, n. 18, p. 1941-1967, 2014.

HOLAHAN, M. R. A shift from a pivotal to supporting role for the growth-associated protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 11, p. 266, 2017.

ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009.

JAGGI, A. S.; SINGH, N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology*, v. 291, n. 1-3, p. 1-9, 2012.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chemical reviews*, v. 99, n. 9, p. 2467-2498, 1999.

KARNS, L. R. *et al.* Cloning of complementary DNA for GAP-43, a neuronal growth-related protein. *Science*, v. 236, n. 4801, p. 597-600, 1987.

KIMURA J. *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice*. 2nd ed. Philadelphia: FA Davis; 1989. Chapter 25, Polyneuropathies; p. 462-471.

KLEIN, R.; BROWN, D.; TURNLEY, A. M. Phenoxodiol protects against Cisplatin induced neurite toxicity in a PC-12 cell model. *BMC neuroscience*, v. 8, n. 1, p. 61, 2007.

KRAYCHETE, D. *et al.* Eficácia dos antidepressivos para dor crônica. *Clínica*, v. 71, p. 4020-6777, 2003.

LI, Z.Y. *et al.* The possible involvement of JNK activation in the spinal dorsal horn in bortezomib-induced allodynia: the role of TNF- α and IL-1 β . *Journal of anesthesia*, v. 30, n. 1, p. 55-63, 2016.

LIU, Z. *et al.* Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. PLoS One, v. 10, n. 4, p. e0123278, 2015.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOMONACO, M., *et al.* Cisplatin neuropathy: clinical course and neurophysiological findings. *J Neurol.* 1992 Apr. 239(4):199-204, 1992.

MARTIN, L. G. R.; SILVA, M. D. P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a literature review. *Einstein (São Paulo)*, v. 9, n. 4, p. 538-544, 2011.

MAX, M. B. *et al.* Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. *New England Journal of Medicine*, v. 326, n. 19, p. 1250-1256, 1992.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Cashew nut oil, opportunities and challenges in the context of sustainable industrial development. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 732-741, 2009.

MCDONALD, E. S.; WINDEBANK, A. J. Cisplatin-Induced apoptosis of GRD neurons involves Bax redistribution and cytochrome cRelease but not fas receptor signaling. *Neurobiology of disease*, v. 9, n. 2, p. 220-233, 2002.

MENDONÇA, L. M. Avaliação genotóxica e antigenotóxica da curcumina contra a toxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2008.

MENDONÇA, L. M. *et al.* Curcumin reduces cisplatin-induced neurotoxicity in NGF-differentiated PC12 cells. *Neurotoxicology*, v. 34, p. 205-211, 2013.

MISRA, U. K.; KALITA, J.; NAIR, P. P. Diagnostic approach to peripheral neuropathy. *Annals of Indian Academy of Neurology*, v. 11, n. 2, p. 89, 2008.

MOLLMAN, J. E. *et al.* Cisplatin neuropathy. Risk factors, prognosis, and protection by WR-2721. *Cancer*, v. 61, n. 11, p. 2192-2195, 1988.

MORAIS, S. M. *et al.* Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. *Pharmaceuticals*, v. 10, n. 1, p. 31, 2017.

MOUTINHO, M.; LANDRETH, G. E. Therapeutic potential of nuclear receptor agonists in Alzheimer's disease. *Journal of lipid research*, v. 58, n. 10, p. 1937-1949, 2017.

O'CONNOR, A. B.; DWORKIN, R. H. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *The American journal of medicine*, v. 122, n. 10, p. S22-S32, 2009.

OSHITA, F.; EASTMAN, A. Gene-specific damage produced by cisplatin, ormaplatin and UV light in human cells as assayed by the polymerase chain reaction. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, v. 5, n. 3, p. 111-118, 1993.

PARK, S. B., KRISHNAN, A. V *et al.* Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Current medicinal chemistry*, v. 15, n. 29, p. 3081-3094, 2008.

PAULINO, R. *et al.* Riqueza e importância das plantas medicinais do Rio Grande do Norte. 2011.

SAHIN, C. Characterizing Novel PPAR Agonists Derived from Cashew Nut Shell Liquid for Treatment of Metabolic Disease. Diss. University of Toronto (Canada), 2017.

SHOKOOHINIA, Y. *et al.* Protective effect of bioactive compounds from *Echinophora cinerea* against cisplatin-induced oxidative stress and apoptosis in the PC12 cell line. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 20, n. 4, p. 438, 2017.

STAFF, N. P. *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. *Annals of neurology*, v. 81, n. 6, p. 772-781, 2017.

TAKESHITA, M. *et al.* The pivotal role of intracellular calcium in oxaliplatin-induced inhibition of neurite outgrowth but not cell death in differentiated PC12 cells.

Chemical research in toxicology, v. 24, n. 11, p. 1845-1852, 2011.

TREVISAN, M. T. S. *et al.* Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 2, p. 188-197, 2006.

WOZNIAK, K.; CZECHOWSKA, A.; BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Chemico-biological interactions*, v. 147, n. 3, p. 309-318, 2004.

WU, Y. *et al.* Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 339, n. 2, p. 403-411, 2011.

YANG, L. Y.; LI, L.; *et al.* Expression of ERCC1 antisense RNA abrogates gemcitabine-mediated cytotoxic synergism with cisplatin in human colon tumor cells defective in mismatch repair but proficient in nucleotide excision repair. *Clinical Cancer Research*, v. 6, n. 3, p. 773-781, 2000.

ZOLEZZI, J. M. *et al.* PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biological Reviews*, v. 92, n. 4, p. 2046-2069, 2017.

ZWELLING, L. A.; ANDERSON, T.; KOHN, K. W. DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by cis-and trans-platinum (II) diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity. *Cancer research*, v. 39, n. 2 Part 1, p. 365-369, 1979.