UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

JOÃO CARLOS SOUSA MACIEL

PADRONIZAÇÃO DE CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS SENSORIAIS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES PPAR EM CÉLULAS TRATADAS COM CISPLATINA

BRASÍLIA, DF
2015

JOÃO CARLOS SOUSA MACIEL

PADRONIZAÇÃO DE CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS SENSORIAIS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES PPAR EM CÉLULAS TRATADAS COM 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

BRASÍLIA, DF

2015

JOÃO CARLOS SOUSA MACIEL

PADRONIZAÇÃO DE CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS SENSORIAIS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES PPAR EM CÉLULAS TRATADAS COM CISPLATINA

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Djane Braz Duarte

(FS/Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Mani Indiana Funez

(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Michella Coelho

(FS/ Universidade de Brasília)

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e sustento a cada amanhecer, por mais esta conquista.

Aos meus pais, Dari Maciel e Sirlene Souza, por acreditarem e fomentarem meus sonhos. Vocês são meus exemplos de fé, determinação, honestidade e sucesso.

Aos meus irmãos, João Paulo Maciel e João Victor Maciel, meus melhores amigos, pelo verdadeiro companheirismo; cada palavra de apoio e incentivo que vieram de vocês, fortaleceram-me nos momentos mais difíceis que passei. Sem vocês, não haveria mérito!

Ao meu amor, Catarine Santos, pela compreensão, dedicação, carinho e cuidado durante todos esses anos de graduação. Amo-te em demasia.

A minha querida orientadora, professora Dra. Djane Braz, por seus ensinamentos diários e incomparável entusiasmo. Ao trabalhar com a senhora pude perceber o quão podemos ser cada vez melhores naquilo que fazemos! Minha eterna gratidão!

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Molecular – FarMol, pela convivência e troca de experiências.

A minha amada amiga, Maria Lúcia, por estar ao meu lado sempre, apoiando-me e incentivando-me; obrigado por tudo, querida!

A todos os meus amigos de graduação, em especial Glívia Santana, Simone Akonteh, Thais Cristina e Cristhian Kelvin, “farmafriends”, por compartilharem comigo momentos de alegria, aprendizado, incertezas e sonhos.

A todos os professores (as) da Universidade de Brasília - Faculdade de Ciências da Saúde, pelo ensino e pela contribuição na minha formação acadêmica.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!”

Mário Quintana

RESUMO

Em pacientes no tratamento de câncer, o desenvolvimento de neuropatia periférica é um importante efeito secundário, dose limitante, resultante do uso de agentes antineoplásicos derivados da platina, como por exemplo a Cisplatina. Proteger os neurônios de um potencial dano causado por drogas antineoplásicas pode ser uma estratégia promissora e receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) apresentam-se como potenciais candidatos, já que um número crescente de estudos tem demonstrado que a ativação destes induz neuroproteção em modelos de doenças neurodegenerativas e de injúria da medula espinhal. Desta forma, com o objetivo de avaliar a expressão proteica de PPAR gama e alfa em amostras de Gânglio da Raiz Dorsal (GRD) foram padronizados os protocolos de Western blot e cultura primária de neurônios sensoriais. Nossos resultados demonstram que há expressão dos subtipos gama e alfa destes receptores em amostras de células de GRD. Além disso, culturas de neurônios sensoriais são viáveis quando mantidas por até 7 dias em incubadoras com 5% de CO_2 e 37°C e o tratamento destas com cisplatina (24h – 30μM) não alterou a expressão do receptor PPARγ.

Palavras Chaves: neurotoxicidade, PPAR, neurônio sensorial, quimioterapia, gânglio da raiz dorsal.

ABSTRACT

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy is an important side effect of anti-cancer therapy such as cisplatin. An interesting approach to counteract this side effect is to protect neurons from the toxicity caused by these agents and Peroxisome proliferator-activated receptors could be a potential candidate, since there are a number of studies showing that the activation of these receptors is neuroprotective in models of chronic injury of the nervous system. The aim of this study is to investigate the pattern of PPAR gamma and alpha expression in dorsal root ganglia (DRG) cells and also evaluate whether cisplatin treatment alters PPAR expression. Ours results show that there is expression of both subtype receptors in the DRG and that our *in vitro* model of primary sensory neurons culture is viable (7 days in 5% de CO_2, 37°C). However, there is no change in PPARγ expression in cultures treated with cisplatin 30 μM for 24 hours.

Keywords: neurotoxicity, PPAR, sensory neurons, chemotherapy, Dorsal root ganglia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação de adutos de DNA com Cisplatina.

Figura 2: Organização estrutural comum dos membros da superfamília dos receptores nucleares e suas funções.

Figura 3: Mecanismo de regulação da transcrição gênica do PPAR.

Figura 4: Visão esquemática do processamento enzimático do GRD e dissociação dos neurônios sensoriais.

Figura 5: Esquema de extração, semeadura, tratamento e coleta das células.

Figura 6: Avaliação da expressão de PPARγ e PPARα em GRD.

Figura 7: Fotomicrografia de cultura de células primárias.

Figura 8: Avaliação da expressão de PPARγ em cultura de células primárias tratadas com cisplatina.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF-2 - Função de ativação transcricional 2.

AF-1 - Função de ativação trasncricional 1.

CGRP - Neuropeptídeo relacionado ao gene da calcitonina.

CO_2 - Dióxido de carbono.

COOH - Carboxi-terminal.

COX-2 - Ciclooxigenase-2.

d(ApG) - Ligação/aduto formado entre a posição N-7 de uma guanina e a posição N-7 de uma adenina adjacente.

d(GpG) - Ligação/aduto formado entre duas guaninas adjacentes pela interação entre a posição N-7.

d(GpXpG) - Ligação/aduto formado entre duas guaninas que possuem outra base entre elas.

DBD - Domínio de ligação ao DNA.

DNA - Ácido desoxirribonucleico.

***et al* -** e outros.

E.P.M - Erro padrão da média.

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

GRD - Gânglio da raiz dorsal.

HAT - Histona acetiltransferase.

HDAC - Histona desacetilase.

HRE - Elemento responsivo.

IL-6 - Interleucina-6.

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida.

LBD - Domínio de ligação ao ligante.

LBP - Bolso de ligação ao ligante.

mtDNA - DNA mitocondrial.

N-7 - Nitrogênio da sétima posição.

NaCl - Cloreto de sódio.

NF-kB - Fator nuclear kappa B.

NGF - Fator de crescimento do nervo.

NH2-t - Amino terminal.

NO - Óxido nítrico.

NP - Neuropatia periférica.

PPAR - Receptor ativado por proliferador peroxissomal.

PPARα - Receptor ativado por proliferador peroxissomal (subtipo α).

PPARγ - Receptor ativado por proliferador peroxissomal (subtipo γ).

PVDF - difluoreto de polivinilideno.

RN - Receptor nuclear.

RXR - Ácido 9-cis-retinoico.

TBT - Proteína de ligação TATA.

TRPV1 - Receptor de Potencial Transitório Vaniloide do tipo 1

VCAM-1 - Molécula de adesão de célula vascular.

Sumário

1. INTRODUÇÃO 13

1.1. Neuropatia Periférica (NP) 13

1.2. Cis-diamino-dicloro-platina II 14

1.3. Tratamento da Neuropatia periférica 17

1.4. Receptores Nucleares 19

1.4.1. Receptores PPAR 22

2. JUSTIFICATIVA 24

3. OBJETIVOS 25

3.1. Objetivo geral 25

3.2. Objetivos específicos 25

4. MATERIAIS E MÉTODOS 26

4.1. Animais 26

4.2. Materiais 26

4.3. Isolamento de neurônios sensoriais primários 27

4.4. Tratamento da cultura de células com cisplatina 28

4.5. Quantificação e expressão proteica – Western blot 29

4.6. Análise Estatística 30

5. RESULTADOS 31

5.1. Avaliação da expressão de PPARα e PPARγ em GRD. 31

5.2. Padronização do modelo *in vitro* de cultura primária de neurônios sensoriais 31

5.3. Avaliação da expressão de PPARγ em células tratadas com cisplatina 32

6. DISCUSSÃO 34

7. CONCLUSÃO 38

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....39

ANEXO.....48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Neuropatia Periférica (NP)

A neurotoxicidade refere-se à capacidade que certos agentes químicos possuem de induzir alterações no sistema nervoso central, nervos periféricos e órgãos sensoriais, de modo a promover uma disfunção neuronal ou alteração da estrutura química do sistema nervoso (SIMONSEN, *et al*., 1994).

Quanto ao sistema nervoso periférico, este pode ser vulnerável à ação tóxica de várias drogas, uma vez que não é protegido pela barreira hematoencefálica, como o sistema nervoso central. Desta forma, a neurotoxicidade induzida por drogas antineoplásicas pode afetar as fibras nervosas ou os corpos neuronais de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal (GRD) (ARGYRIOU, *et al.*, 2012).

A neurotoxicidade periférica induzida pelos agentes antineoplásicos é frequentemente um efeito secundário dose limitante. Além disso, mesmo quando a neurotoxicidade periférica não é fator limitante da dose, o seu início pode afetar significativamente atividades da vida diária e diminuir a qualidade de vida de pacientes com câncer, uma vez que pode ser extremamente dolorosa e/ou incapacitante (ARGYRIOU, *et al*., 2012; WINDEBANK, 1999).

Os danos estruturais causados pelos agentes antineoplásicos ao sistema nervoso podem resultar em processamento somatossensorial aberrante no sistema nervoso central e/ou periférico (WINDEBANK, 1999). Deste modo, a Neuropatia Periférica induzida por quimioterapia (NPIQ), caracteriza-se como uma neurotoxicidade periférica resultante da disfunção ou degeneração dos neurônios periféricos, em seu trajeto da medula espinhal até a periferia (STUBBLEFIELD, *et al*. 2009).

A neuropatia pode afetar tanto axônios de pequeno diâmetro (ocasionando alterações sensoriais tais como diminuição da sensibilidade para temperatura e picada de agulha), quanto axônios de grande diâmetro (ocasionando alteração nas sensações de vibração e propriocepção, por exemplo). A evolução clínica comum inicia com parestesias

(formigamento, por exemplo) e disestesias, comumente localizadas nos dedos dos pés e das mãos (LOMONACO, *et al*., 1992).Os sintomas, em geral, surgem no decorrer do tratamento quimioterápico, podendo desaparecer ou mesmo piorar após a interrupção do mesmo. (ARGYRIOU, *et al.*, 2010).

Dentre os agentes quimioterápicos mais frequentemente associados à neuropatia periférica estão os compostos de platina (VIVOSKY, *et al*., 2007).

1.2. Cis-diamino-dicloro-platina II

Entre os diferentes agentes antineoplásicos, a cisplatina (Cis-diamino-dicloro-platina II) é um quimioterápico utilizado no tratamento de primeira linha para cânceres de testículo e ovário metastático. Cerca de 20% dos pacientes que fazem uso desta droga são incapazes de completar um ciclo completo, devido ao desenvolvimento da neuropatia periférica (MCDONALD, *et al*., 2005). O mecanismo de ação antitumoral da cisplatina e de outros compostos derivados da platina é a formação de adutos de platina-DNA levando a célula à apoptose (EASTMAN, 1987; WOYNAROWSKI, *et al*., 1998).

Em síntese, a cisplatina é ativada ao entrar na célula, por difusão passiva ou difusão ativa, através da participação de transportadores de cobre e transportadores catiônicos orgânicos (ELJACK, *et al*., 2014). No citoplasma, os átomos de cloro na cisplatina são deslocados por moléculas de água. Este produto hidrolizado é um potente eletrófilo que pode reagir com qualquer nucleófilo, incluindo os grupos sulfidrila em proteínas e os átomos doadores de nitrogênio em ácidos nucleicos. Assim, a cisplatina liga-se ao centro reativo N7 em resíduos de purina e, desta forma, pode gerar danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) de células, tais como distorções na dupla hélice da molécula de DNA, conduzindo à torção de sua estrutura, de modo a bloquear a divisão celular, resultando em morte celular programada (apoptose). (BECK e BRUBAKER, 1973; FRAVAL, *et al*., 1978; JAMIESON e LIPPARD, 1999).

As ligações cruzadas 1,2-intracadeia de bases purínicas com cisplatina são as mais notáveis entre as mudanças no DNA. Estes incluem os adutos 1,2-intracadeia

d(GpG) - entre duas guaninas adjacentes pela interação entre a posição N-7 - e adutos 1,2-intracadeia d(ApG) - entre a posição N-7 de uma guanina e a posição N-7 de uma adenina adjacente-, os quais representam cerca de 90% e 10% de adutos, respectivamente. Adutos 1,3-intracadeia d(GpXpG) - ocorrem entre duas guaninas que possuem outra base entre elas - e outros adutos, tais como ligações cruzadas intercadeia e adutos não funcionais, também tem sido relatados na toxicidade da cisplatina (BECK e BRUBAKER, 1973; FRAVAL, *et al*., 1978). **Figura 1**.

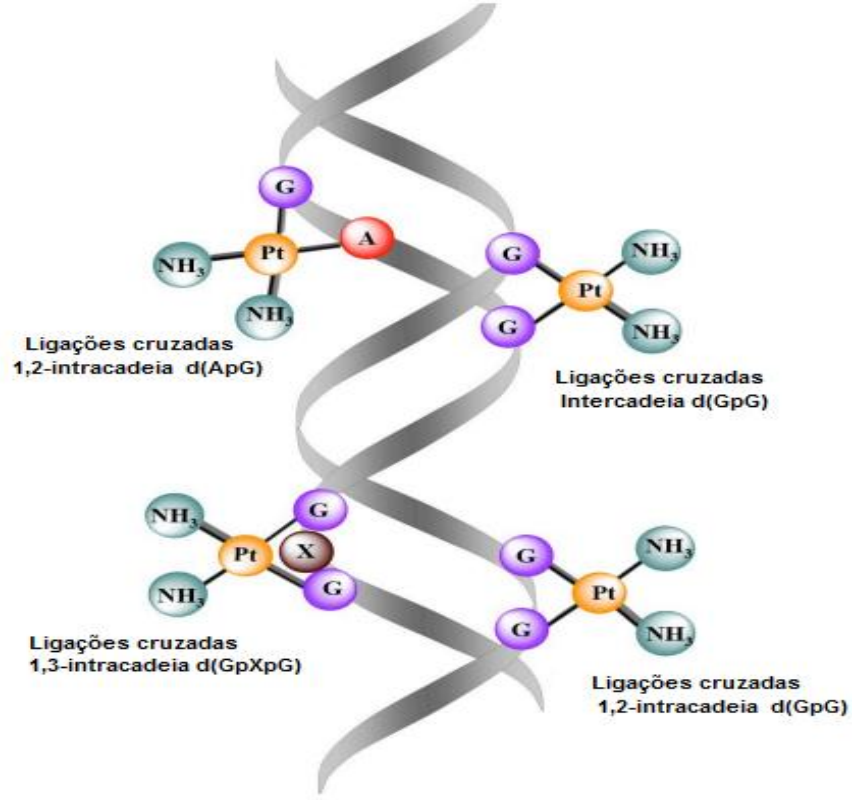

Figura 1: Formação de adutos de DNA com Cisplatina, deixando dois grupamentos amino coordenados no átomo de platina. Adaptada de BOULIKAS *et al*., 2007.

No entanto, ainda objeto de estudo é se a neurotoxicidade é uma consequência da ativação dos mesmos mecanismos que produzem morte celular nas células cancerígenas. Embora estas drogas preferencialmente afetem células que se dividam rapidamente, várias evidências experimentais indicam que a cisplatina atua diretamente no corpo celular e células adjacentes dos neurônios aferentes primários no GRD. Após

administração sistêmica de cisplatina, o acúmulo de adutos de platina-DNA é maior em neurônios do GRD do que em qualquer outro tecido e a gravidade da neurotoxicidade está relacionada com a quantidade de adutos formada (TA, *et al*., 2006; MCDONALD, *et al*., 2005).

Além disso, outros autores demonstraram que a cisplatina também forma adutos com o DNA mitocondrial (mtDNA) de neurônios do GRD, alterando a replicação bem como a transcrição do mtDNA. Assim, a disfunção mitocondrial induzida por cisplatina poderia ser um novo mecanismo de neurotoxicidade da cisplatina (PODRATZ, *et al*., 2011). Ainda, Tomaszewski *et al.* (2007) demonstraram que a cisplatina reduz a corrente dos canais de cálcio ativados por voltagem em neurônios de pequeno diâmetro (≤20 μm), o que pode representar outro possível mecanismo fisiopatológico da neurotoxicidade causada pela cisplatina.

Ta *et al*. (2010) mostraram que o tratamento de culturas de neurônios do GRD com cisplatina e oxaliplatina - análogo à cisplatina, resulta em aumento da regulação do RNAm dos receptores TRPV1 (Receptor de potencial transitório vaniloide do tipo 1), o qual é ativado pelo calor nocivo - 42ºC e inflamação; TRPA1 (Receptor de potencial transitório da anquirina 1), possuindo papel funcional na dor e inflamação neurogênica; bem como TRPM8 (Receptor de potencial transitório da melastatina 8), responsável pela percepção aos estímulos frios - 28,4ºC. Deste modo, o aumento da regulação do RNAm de TRPV1 e TRPA1 refletem no aumento da responsividade destes receptores nos nociceptores que contribuem para os mecanismos moleculares da hiperalgesia térmica e alodinia mecânica induzida por cisplatina, observada em modelos animais de ratos .

Outro fenômeno observado em modelos de dor neuropática induzida pela cisplatina está relacionado à liberação de glutamato excitotóxica. Este resulta em neurotransmissão glutamatérgica excessiva e a ativação do receptor N-metil-d-aspartato (NMDA), observado através da ativação de neurônios de segunda ordem. Estes neurônios conduzem o impulso sensorial da medula espinhal até o tálamo, resultando em

sensibilização central, a qual está relacionada ao fenômeno de hiperalgesia secundária, isto é, hiperalgesia em sítios vizinhos à lesão (WOOLF e SALTER, 2000; WOOLF, 2011).

1.3. Tratamento da Neuropatia periférica

A maioria das terapias disponíveis para o tratamento da neuropatia periférica induzida por quimioterápicos (NPIQ) permanecem ineficazes. As duas formas de tratamento mais comuns são classificadas em preventivo e sintomático.

Os tratamentos preventivos são destinados à redução da incidência ou gravidade da neuropatia periférica em pacientes que receberam agentes neurotóxicos. Os fármacos utilizados devem reduzir não apenas o efeito neurotóxico do quimioterápico, como também manter o efeito anti-tumoral do mesmo. Dentre os fármacos comumente utilizados no tratamento preventivo, têm-se a infusão de cálcio/magnésio, vitamina E, glutationa, N-acetilcisteína bem como a L-carnitina (KALEY e DEANGELIS, 2009).

A infusão de cálcio/magnésio, glutamina, vitamina E, glutationa e N-acetilcisteína, também são relatados na literatura como compostos eficazes na redução da ocorrência da NPIQ, frente ao tratamento com placebo (WOLF *et al*., 2008). Os mecanismos envolvidos nestes efeitos são pouco conhecidos, mas sugere-se que vitamina E, glutationa e N-acetilcisteína, em função de suas propriedades antioxidantes, atuariam na redução do estresse oxidativo em neurônios periféricos (KALEY e DEANGELIS, 2009).

A L-carnitina também tem sido relacionada a efeitos neuroprotetivos, através da modulação da expressão do NGF (fator de crescimento do nervo). Desta forma, a Acetil-l-carnitina pode promover a regeneração do nervo após a lesão (PISANO *et al*, 2003; FLATTERS *et al*, 2006).

Os tratamentos sintomáticos visam o alívio dos sintomas apresentados pelos pacientes que já desenvolveram a neuropatia periférica, após o uso de medicamentos neurotóxicos. Desta forma, as opções para o tratamento sintomático não são específicas para a NPIQ, de modo que são empregados fármacos utilizados em outras formas de dor neuropática especialmente às relacionadas ao diabetes *mellitus*. Assim, incluem-se como

tratamento farmacológico antidepressivos, anticonvulsivantes e analgésicos opióides (KALEY e DEANGELIS, 2009).

Os antidepressivos triciclicos (ADT), tais como amitriptilina e nortriptilina, têm sido muito utilizados no tratamento de sintomas de várias formas de neuropatia. No entanto, estudos clínicos mostram que os ATC apresentam baixa eficácia contra a NPIQ. Estes fármacos podem exercer seus efeitos através da inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina, à nível da medula espinhal, resultando no controle da transmissão espinhal da dor (HAMMACK *et al*., 2002; KAUTIO *et al.,* 2008).

O uso de anticonvulsivantes na dor neuropática resulta, em grande parte, do mecanismo de hiperexcitabilidade neuronal como causa dos sintomas, tais como parestesias. Assim, estes fármacos atuam reduzindo a hiperexcitabilidade de neurônios periféricos através da inibição da atividade dos canais de sódio, carbamazepina e lamotrigina, bem como canais de cálcio, gabapentina e pregabalina (O'CONNOR e DWORKIN, 2009).

Os analgésicos opióides (morfina, oxicodona, metadona ou tramadol), apresentam-se como segunda escolha no tratamento da dor neuropática. O efeito analgésico destes fármacos é resultante da interação destes com receptores opióides (δ, κ e μ) no sistema nervoso periférico e/ou central. A nível periférico, a excitabilidade dos neurônios sensoriais aferentes primários é diminuída pelos opióides, através do fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem, bem como a abertura dos canais de potássio. Tal efeito também é observado sobre as terminações centrais de neurônios aferentes primários na medula espinhal, resultando no efeito analgésico (O'CONNOR e DWORKIN, 2009). Assim, vários mecanismos pré e pós-sinápticos têm sido implicados na analgesia opióide, incluindo além dos canais já citados, os canais de potássio retificadores internos ativados pela proteína G (GIRK), os quais, quando ativados, contribuem para as ações inibitórias dos opióides e outros neurotransmissores (MARKER, *et al*., 2005; LÜSCHER, *et al*., 1997). No entanto, os opióides não são

recomendados para uso rotineiro, como primeira linha, devido aos seus efeitos secundários, tais como dependência e tolerância (O'CONNOR e DWORKIN, 2009).

Com base no exposto, até o momento, não foram desenvolvidas terapias-padrão, eficazes no tratamento da NPIQ. As opções disponíveis para o tratamento da dor, muitas vezes, resultam em efeitos secundários, que limitam a continuidade da terapia antineoplásica. Neste sentido, faz-se necessário que novas abordagens terapêuticas sejam desenvolvidas, por exemplo, que visem mecanismos de neuroproteção.

1.4. Receptores Nucleares

Proteger os neurônios de um potencial dano causado por drogas antineoplásicas pode ser uma estratégia promissora, e os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs), membros da superfamília dos receptores nucleares, apresentam-se como potenciais candidatos.

Os receptores nucleares (RN) constituem uma superfamília de proteínas que funcionam como reguladores transcricionais (positivos e negativos) de variados genes envolvidos em importantes funções fisiológicas, incluindo o controle do desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, bem como a manutenção da homeostase metabólica (GRONEMEYER, *et al*., 2004; SONODA, *et al*., 2008).

O gene da superfamília dos receptores nucleares hormonais (também denominado gene da superfamília do receptor do hormônio esteroide/tireoidiano) codifica receptores intracelulares para glicocorticoides, andrógenos, mineralocorticoides, progesterona, estrogênio, hormônios tireoidianos, vitamina D, ácido retinoico, ácido 9-cis-retinoico, ácidos graxos, bem como outros receptores para ligantes, tais como o hormônio ecdisona, presente em insetos, e fatores indeterminados ativados por proliferadores de peroxissoma (RIBEIRO, *et al*., 1995).

Todos os membros da superfamília de receptores nucleares compartilham de uma organização estrutural comum, a qual, sucintamente, pode ser dividida em quatro domínios funcionais ou regiões, como ilustrado na **Figura 2**:

- **A região N-terminal (NH_2-t)** contém uma função de ativação transcricional independente do ligante, referido como função de ativação 1 (AF-1), que pode funcionar de forma autônoma. Nenhuma estrutura cristalina deste domínio foi elucidada até o momento. O comprimento e a sequência deste, nos diferentes receptores nucleares (RNs), são altamente variáveis, revelando uma conservação evolutiva pouco significativa. Além disso, esta região NH_2-t pode interagir com co-fatores, tais como coativadores ou outros fatores de transcrição.
- **A região central C (DBD - Domínio de ligação ao DNA)** de receptores nucleares (RNs) é o domínio mais conservado. Investigações *in vitro* demonstraram que, através deste domínio, RNs se ligam a sequências específicas de DNA, chamadas de elementos responsivos hormonais (HREs). Estudos revelaram que o DBD consiste em um núcleo de 66 resíduos altamente conservados, constituído por dois dedos de zinco (*zinc fingers*) ricos em cisteína, duas hélices, e uma extensão carboxi-terminal (COOH). O P-box é a parte altamente conservada no primeiro dedo de zinco entre as duas últimas cisteínas e determina a especificidade da sequência de ligação ao elemento responsivo. Outra parte conservada no segundo dedo de zinco é a D-box, a qual determina a dimerização do receptor. Assim, dependendo do tipo do receptor, a extensão COOH desempenha um papel importante na sequência de reconhecimento e/ou dimerização.
- **A região D**, que é um domínio pouco conservado, é considerado como uma dobradiça entre o DBD e o LBD, permitindo a rotação do DBD. Portanto, esta região permite que os DBDs e LBDs adotem diferentes conformações, sem criar problemas de impedimento estereoquímico.
- **LBD.** Menos conservado que o DBD, o LBD (Domínio de ligação ao ligante) contém quatro superfícies estruturalmente distintas mas funcionalmente ligadas: 1) uma superfície de dimerização, que medeia a interação com LBDs parceiras; 2) um bolso de ligação ao ligante (LBP), que interage com diversas moléculas

pequenas lipofílicas; 3) uma superfície de ligação coreguladora, que se liga a complexos de proteínas reguladoras, as quais modulam positivamente ou negativamente a atividade de transcrição e 4) uma função de ativação da hélice, denominado FA-2, que medeia a transativação dependente de ligante (GERMAIN, *et al*., 2006; ROBINSON-RECHAVI, *et al*., 2003).

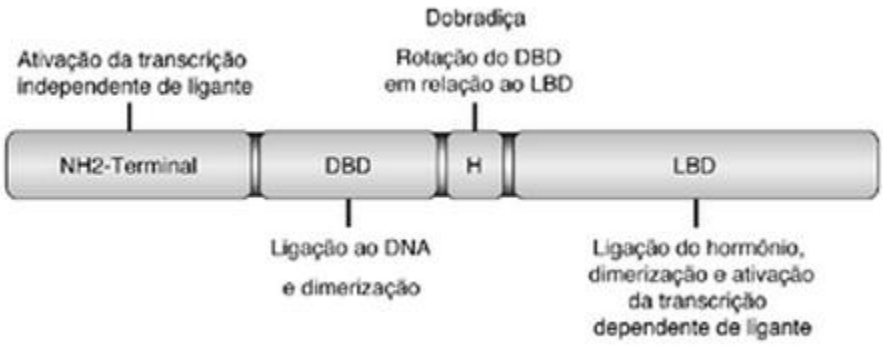

Figura 2: Organização estrutural comum dos membros da superfamília dos receptores nucleares e suas funções: Domínio amino-terminal (NH2-t), domínio de ligação ao DNA (DBD), dobradiça (*hinge*), domínio de ligação ao ligante (LBD). BARRA, *et al.,* 2004.

Os receptores nucleares atuam, classicamente, em três etapas: repressão, desrepressão e ativação da transcrição. A repressão é característica do receptor apo-nuclear, o qual recruta um complexo co-repressor com atividade histona desacetilase (HDAC). A desrepressão ocorre após a ligação do ligante que dissocia este complexo e recruta um primeiro complexo coativador, com atividade histona acetiltransferase (HAT), resultando na descondensação da cromatina, o que se acredita ser necessário, mas não suficiente para a ativação do gene alvo. Na terceira etapa, o complexo HAT se dissocia e um segundo complexo co-ativador é formado, o qual é capaz de estabelecer contato com a maquinaria de transcrição basal, e, portanto, resulta na ativação da transcrição do gene (ROBINSON-RECHAVI, *et al*., 2003).

1.4.1. Receptores PPAR

Os PPAR são receptores hormonais, que quando ativados induzem proliferação peroxissomal. Em síntese, o PPAR sofre dimerização ligando-se com o receptor do ácido 9-cis-retinoico (RXR), outro receptor nuclear. Em seguida, proteínas co-ativadoras são recrutadas, e o complexo é translocado para o núcleo celular, ligando-se ao seu respectivo elemento responsivo, situado em sítios regulatórios de cada gene. Assim, um macro complexo é formado recrutando a maquinaria de transcrição celular basal, dentre elas, as proteínas TBT (TATA *box binding protein*), resultando na regulação da transcrição gênica (RIBEIRO, *et al*., 1995; STEINMETZ, *et al*., 2001). **Figura 3.**

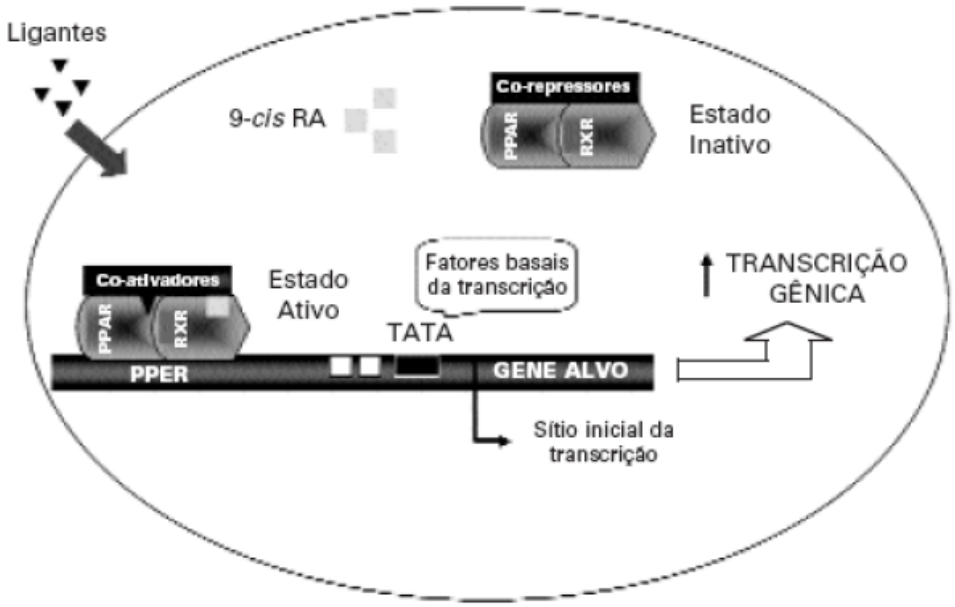

Figura 3: Mecanismo de regulação da transcrição gênica do PPAR. Requer a liberação do complexo co-repressor (atividade histona desacetilase), induzida por ligante, e o recrutamento do complexo co-ativador (atividade acetiltransferase). O complexo PPAR:RXR ativado, liga-se ao elemento responsivo, resultando em alteração na estrutura da cromatina, com formação de uma estrutura transcricionalmente competente. TAVARES, *et al*., 2007.

Até o momento, três isotipos diferentes de PPAR foram identificados em diversas espécies: PPARα, PPARβ/δ e PPARγ (DESVERGNE e WAHLI, 1999; BERGER e MOLLER, 2002).

O PPARγ (gama) é o subtipo mais extensivamente estudado dentre os três, sendo expresso principalmente no tecido adiposo branco e marrom e, em menor grau, em outros tecidos, possuindo papel central no processo de diferenciação dos adipócitos, utilização da glicose periférica e sensibilização à insulina. Além disso, o PPARγ desempenha um papel crucial no controle da resposta inflamatória, pela inibição da expressão de genes pró-inflamatórios (KLIEWER, *et al*., 1994; CHAWLA, *et al.*, 1994; BRAISSANT, *et al*., 1996; RIZZO e FIORUCCI, 2006).

O PPARα (alfa) é predominantemente expresso no fígado, sendo também encontrado no rim, coração, tecido adiposo marrom, endotélio e músculo esquelético. A ativação destes receptores induz repressão da expressão de diferentes genes inflamatórios induzida por citocinas, tal como molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1), bem como ciclooxigenase-2 (COX-2) e interleucina 6 (IL-6). Este mecanismo se dá pela interferência na atividade transcricional do fator nuclear kappa B (NF-kB), modulando assim a expressão de Óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em astrócitos humanos e Cox-2 em células do músculo liso, por exemplo (STAELS, *et al*., 1998; MARX, *et al.,* 1999; DELERIVE, *et al*., 2000; PAHAN, *et al*., 2002) .

O PPARβ/δ é altamente expresso no tubo neural em desenvolvimento (BRAISSANT e WAHLI, 1998), bem como no cérebro adulto (BRAISSANT *et al*., 1996). Em culturas primárias de neurônios de camundongos, foi encontrada elevada expressão de PPARβ/δ em oligodendrócitos (GRANNEMAN *et al*., 1998). Sua ativação, através de agonistas seletivos, reduz sinais de inflamação da glia, bem como induz alterações na expressão de genes da mielina, mecanismo evidenciado em modelos de encefalopatia autoimune experimental. Além disto, a ativação do PPARβ/δ reduz a ativação inflamatória microglial, efeito observado através da redução significativa da atividade da IL-1β e iNOS (POLAK *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento da neuropatia periférica em pacientes durante o tratamento quimioterápico dificulta a adesão deste à terapia farmacológica. Ademais, o comprometimento da qualidade de vida destes pacientes, caracterizada pela presença de dor e alterações sensoriais, por vezes, manifesta-se de modo incapacitante. Diante do exposto, torna-se necessário a elucidação dos possíveis eventos moleculares envolvidos no processo da neurotoxicidade induzida por agentes quimioterápicos, a exemplo da cisplatina, de modo a se desenvolver novos agentes neuroprotetores. Assim, dada a sua função neuroprotetora, em modelos de doenças neurodegenerativas, os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) apresentam-se como potenciais alvos de estudo e pesquisa nesta área.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Compreender o papel dos receptores PPAR na neurotoxicidade induzida por cisplatina.

3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a expressão dos receptores PPARα e γ em amostras de Gânglio da Raiz Dorsal (GRD) de ratos Wistar naive, através da técnica de Western Blot;
- Padronizar um modelo de cultura de neurônios sensoriais primários;
- Investigar o papel da cisplatina na modulação da expressão do receptor PPARγ em modelo de neurotoxicidade *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos, machos e fêmeas, da linhagem Wistar (220-320 g). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes Brasileiras para uso de animais para fins científicos (2013) e com aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade de Brasília (UnBdoc 55724/2013) – Ver **Anexo I.** Os animais foram alojados em gaiolas em grupos de quatro (04) com livre acesso à ração de origem comercial, água potável e ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.2. Materiais

Foram utilizados neste trabalho as seguintes drogas: cisplatina, Penicilina G, Sulfato de estreptomicina, 5-fluoro-2'-deoxyuridina, Uridina, Colagenase Tipo 1A, Laminina e Poli-D-Lisina, Coquetel inibidor de fosfatase, Ortovanadato de sódio e Pirofosfato de sódio adquiridos da empresa Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) Soro de cavalo, Fungizona e L-glutamina foram adquiridos da empresa Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. Normocina (Invivogen, San Diego, CA, USA) e Fator de crescimento do nervo (NGF - NIBSC, Blanche Lane, UK).

Para os ensaios de Western Blot, foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpo policlonal de coelho anti-PPAR alfa (Santa Cruz Biotechnology - catálogo SC-9000); anticorpo monoclonal de camundongo anti-PPAR gama (Abcam - catálogo ab41928); anticorpo policlonal de cabra anti-GAPDH (Abcam - catálogo ab9483); anticorpo policlonal de cabra anti-actina (Santa Cruz Biotechnology – catálogo SC-1616), anticorpo secundário policlonal de burro anti-cabra IgG-HRP (Abcam - catálogo ab7125); anticorpo secundário policlonal de cabra anti-camundongo IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology - catálogo SC-2005); anticorpo secundário policlonal de cabra anti-coelho IgG HRP (Abcam - Catálogo ab6721);

4.3. Isolamento de neurônios sensoriais primários

A cultura de células primárias foi estabelecida seguindo protocolo publicado (BURKEY, *et al*., 2004). Os ratos foram eutanasiados em câmara de CO_2 e submetidos à decaptação. A coluna foi lavada em água corrente e armazenada em solução Puck's salina contendo 1,6 µg/ml de Fungizona. Todos os gânglios da raiz dorsal (GRD) foram coletados e transferidos para uma placa de petri 35 mm.

Após incubação a 37°C, 5% de CO_2, durante 1 hora em 0,125% de colagenase, os gânglios foram processados mecanicamente, de modo a promover a dissociação dos neurônios sensoriais, em ambiente estéril, como esquematizado na **Figura 4**.

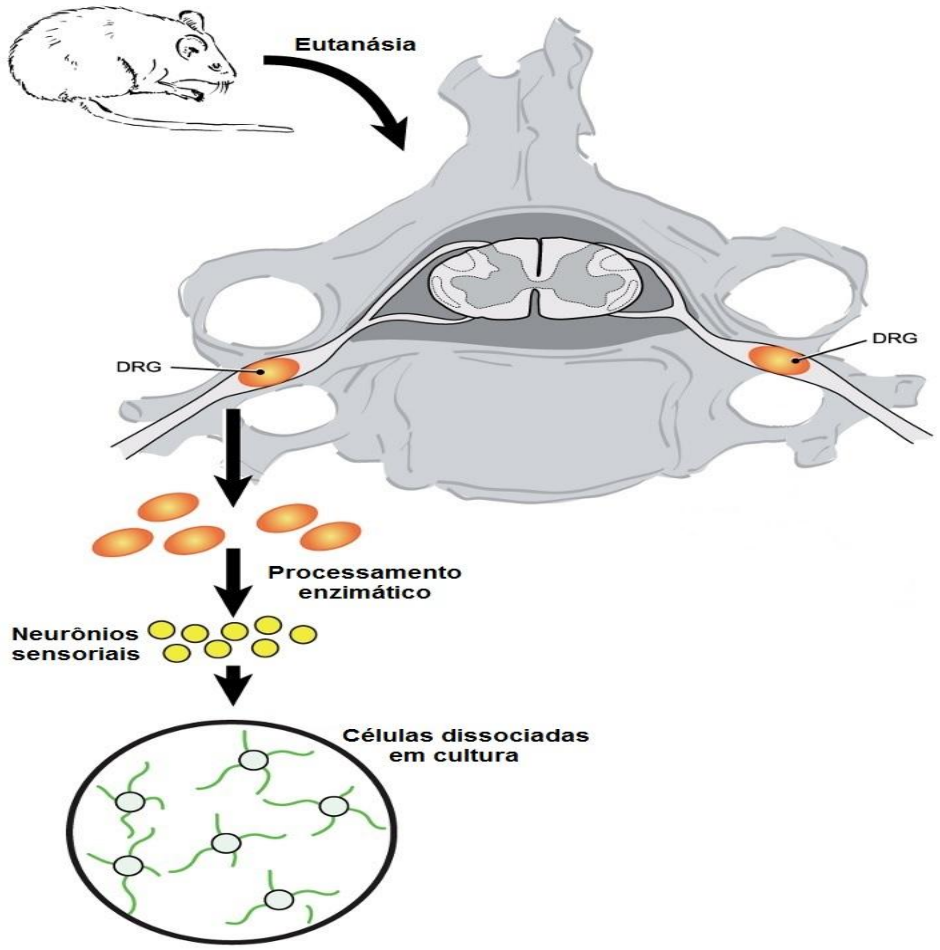

Figura 4: Visão esquemática do processamento enzimático do GRD e dissociação dos neurônios sensoriais. Adaptado de MELLI e HÖKE, 2009.

Aproximadamente 60.000 células foram semeadas em cada poço de uma placa de 6 poços, as quais foram previamente tratados com 100 µg/ml de poli-D-lisina e 5µg/ml de laminina.

As células foram cultivadas em meio de crescimento F-12 suplementado com 10% de soro de cavalo inativado pelo calor, 2 mM de glutamina, 50 µM/ml de penicilina e estreptomicina, 50 µM de 5-flúor-2-desoxiuridina, 150 µM de uridina, 250 ng/ml de fator de crescimento do nervo (NGF) e 100 µg/ml de normocina.

4.4. Tratamento da cultura de células com cisplatina

As culturas foram mantidas numa atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C, e o meio de cultura das células foi trocado 24 horas após a semeadura e posteriormente a cada dois dias. No sexto dia em cultura, as células foram tratadas com 30 µM (30 µmol/L) de cisplatina ou com solução salina 0,9 % (controle negativo), por um período de 24 horas. No sétimo dia, as culturas de células foram coletadas de modo a realizar-se a extração e quantificação proteica, visando avaliar-se a expressão do PPARγ e PPARα, como ilustrado na **Figura 5**.

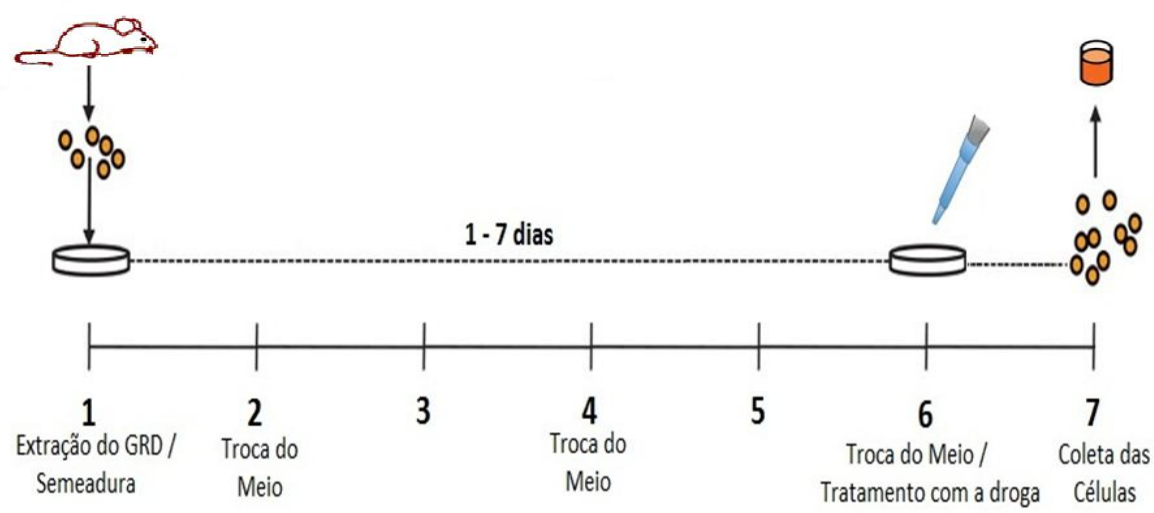

Figura 5: Esquema de extração, semeadura, tratamento e coleta das células.

4.5. Quantificação e expressão proteica – Western blot

Para avaliação da expressão proteica das amostras, foi utilizada a técnica de Western blot. As células foram homogeneizadas manualmente, em tampão RIPA (150 mM de Cloreto de sódio, 1% NP-40, 0,5% de Deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS - sodium duodecyl sufate, 50 mM de Tris base) com coquetel inibidor de protease (1:200) e inibidores de fosfatase (1mM de Pirofosfato de sódio e 1mM de Ortovanadato de sódio).

As amostras foram processadas com o auxílio do aparelho sonicador (Sonics Vibra-Cell) e centrifugadas à 12000 rpm, 4°C, por 5 minutos. O total de proteínas foi determinado em cada amostra por meio do ensaio de Bradford.

Em seguida, 20 µg das amostras foram aplicadas sobre um gel 4–20% Tris-Glicina e a eletroforese foi realizada à 100V. As proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) à 24V durante 1 hora e 30 minutos.

As membranas de PVDF foram bloqueadas em solução salina tamponada com Tris (20 mM de Tris, 500 mM de NaCl, pH 7,5) contendo 0,1% de Tween 20 (TBST) e 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora à temperatura ambiente, e depois incubadas com anticorpo primário para PPARγ (1:1000), PPARα (1:1000), GAPDH (1:5000) ou Actina (1:10000) em TBST com 5% de leite em pó desnatado, overnight à 4°C.

No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBST, 3 vezes com intervalos de 10 minutos, e posteriormente incubada com o anticorpo secundário correspondente, durante 1 hora à temperatura ambiente.

Após repetidas lavagens, as proteínas foram visualizadas com o Kit reagente de detecção ECL-Prime (Amersham, GE Healthcare) e expostas ao filme radiográfico. As imagens foram escaneadas (Epson Stylus TX135) e submetidas à análise densitométrica a partir do software de análise "ImageJ" (ImageJ, NIH, Bethesda, Maryland, USA)**,** segundo protocolo do fabricante

4.6. Análise Estatística

Os dados referentes à **Figura 8** foram expressos em média ± E.P.M. de 3 animais, e foram analisados através do programa Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os tratamentos foram comparados por meio do teste t de Student. *P<0,05* foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da expressão de PPARα e PPARγ em GRD

Para determinar a expressão dos receptores PPAR no Sistema Nervoso Periférico, primeiramente, foi estabelecido o protocolo de Western Blot. Os experimentos foram padronizados para detecção da expressão proteica de PPARγ e PPARα em amostras de GRD de ratos Wistar naive, e os resultados confirmam que há expressão destes, como mostra a **Figura 6**.

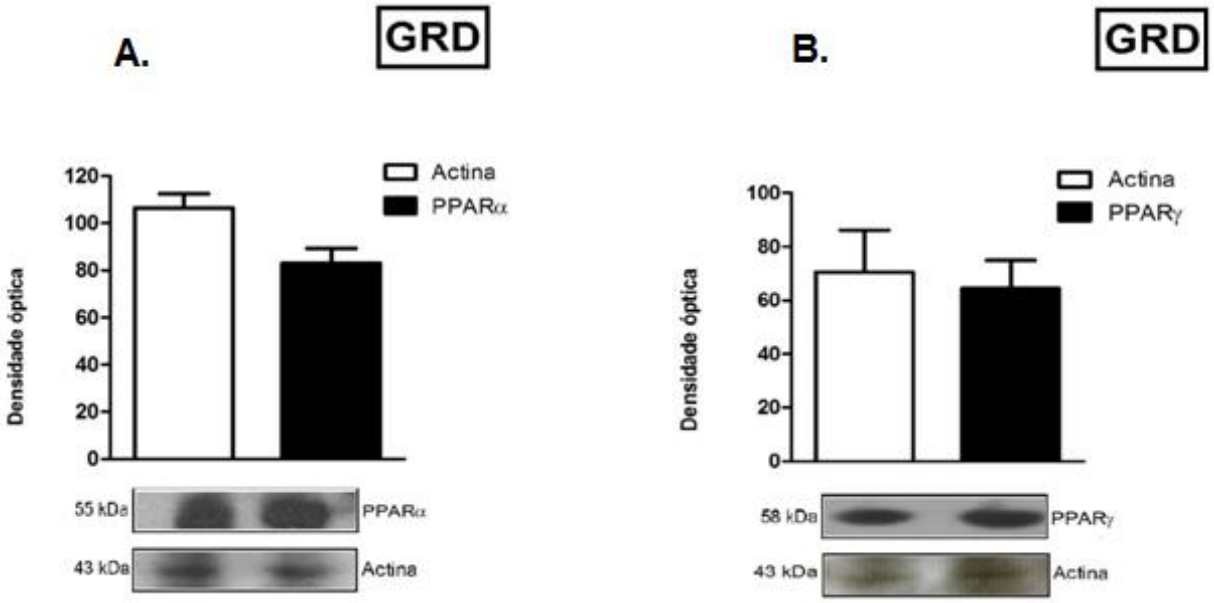

Figura 6: Avaliação da expressão de PPARα e PPARγ em GRD. Amostras de gânglios da raiz dorsal (GRD) de ratos naive foram analisados para a expressão de PPAR alfa e gama, respectivamente, A e B. A análise densitométrica e o Western blot são apresentados; n = 2.

5.2. Padronização do modelo *in vitro* de cultura primária de neurônios sensoriais

Após a constatação da expressão dos subtipos α e γ dos receptores PPAR, foi realizado a padronização do modelo de cultura de neurônios sensoriais primários. Os resultados obtidos por inspeção visual demonstram que as culturas de neurônios

sensoriais são viáveis quando mantidas por até 7 dias em incubadora com 5% de CO_2 à 37°C. Ver **Figura 7**.

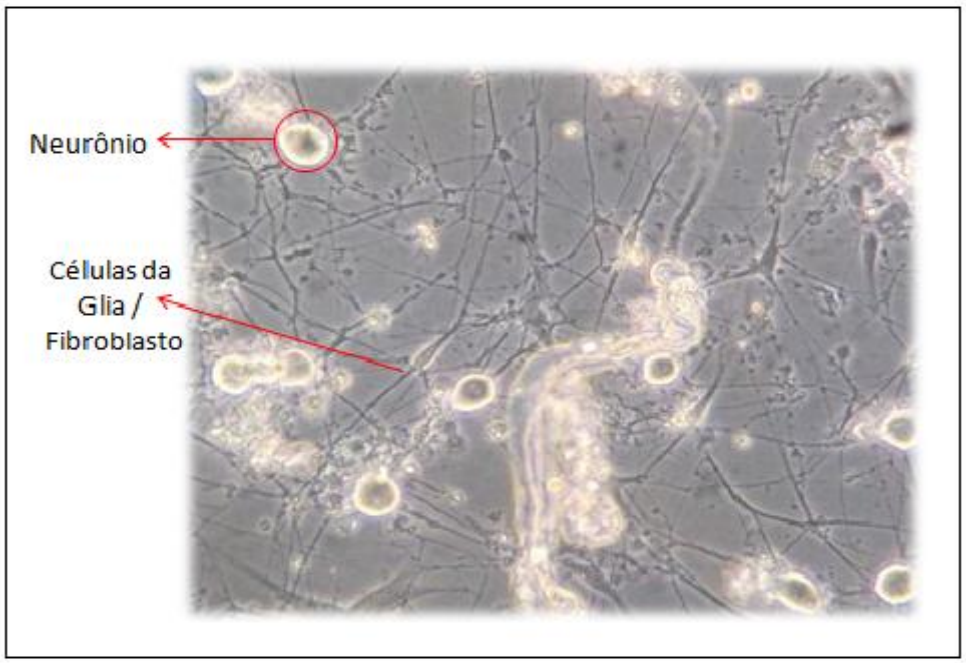

Figura 7: Fotomicrografia de cultura de células primárias. As setas indicam, respectivamente, neurônios sensoriais e células da glia/fibroblastos de ratos adultos (Ampliação de 40 x).

5.3. Avaliação da expressão de PPARγ em células tratadas com cisplatina

Diante dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, procurou-se avaliar a modulação da expressão de receptores PPARγ, frente o tratamento das culturas de células primárias com cisplatina.

Os resultados demonstram que o tratamento com cisplatina (24h – 30μM), não alterou a expressão de PPARγ quando comparado ao grupo controle salina (cisplatina 50.82 ± 6.962 e salina 62.80 ± 21.77 - **Figura 8**).

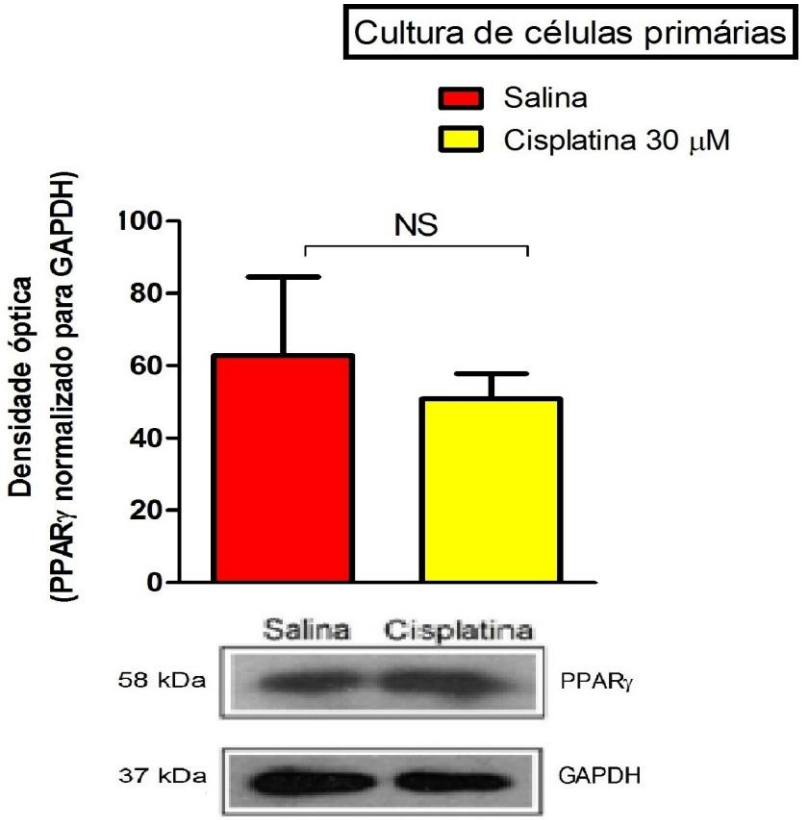

Figura 8: Avaliação da expressão de PPARγ em cultura de células primárias tratadas com cisplatina. Cada coluna representa a densidade da banda imunorreativa de PPARγ normalizada para a banda de GAPDH. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 3 culturas diferentes por grupo; n = 3. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com Cisplatina 30 μmol e Salina 0,9% (teste t de Student; P ≤ 0,05).

6. DISCUSSÃO

A incidência da neuropatia periférica induzida por quimioterápicos pode ser variável, acometendo cerca de 30 a 40% dos pacientes que recebem a quimioterapia (WOLF *et al.*, 2008). Contudo, atualmente não existem terapias completamente eficazes no controle da dor persistente (BURGESS e WILLIAMS, 2010).

Assim, a elucidação dos possíveis mecanismos associados a estas síndromes, ainda é critica, no que concerne a descoberta de novos alvos terapêuticos com atividade analgésica clinicamente mais eficaz.

Mielke *et al.* (2006) mostraram que, em modelos animais de neuropatia periférica, após a administração intravenosa de agentes antineoplásicos, estruturas do sistema nervoso, tais como gânglios da raiz dorsal (GRD), nervos periféricos, bem como a medula espinhal são consideravelmente comprometidos pela droga. Entretanto, em função da ausência de uma barreira vascular, os neurônios sensoriais do GRD ficam mais suscetíveis à ação destes agentes (PETERS, *et al*., 2007).

Neste contexto, é importante salientar o papel neuroprotetor dos receptores proliferadores peroxissomais em modelos experimentais, nos quais agonistas destes receptores foram eficazes no alívio da dor neuropática (FREITAG e MILLER, 2014), sugerindo a potencial aplicação destes no tratamento da dor crônica em humanos.

Ainda, a expressão do receptor nuclear PPAR tem sido estudada em diversas áreas do Sistema Nervoso Periférico e Central, sendo o subtipo γ evidenciado tanto em células neuronais quanto em células da glia. Maeda *et al.* (2008) mostraram a expressão do PPARγ em neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos, através do método de imunohistoquímica. Além disso, sugeriram que a ativação deste receptor inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo de neuropatia induzida por ligadura de nervo.

Quanto ao PPARα, outros autores já haviam demonstrado a presença deste em amostras de GRD de camundongos C57/BL6 e Swiss (LOVERME, *et al*., 2006; D'AGOSTINO, *et al.*, 2009). Ainda, Lovett-Racke *et al*. (2004), sugerem que a ativação de

PPARα inibe a produção de NO por células microgliais, resultando em seu efeito neuroprotetor.

Em consonância com esta ideia, nosso trabalho não apenas confirmou a expressão de PPARγ em amostras de GRD de ratos Wistar, como também demonstrou a expressão do subtipo α deste receptor, como observado na **Figura 6**. Entretanto, para avaliar a expressão dos receptores em amostras de animais naives, foram utilizados anticorpos apenas para as isoformas gama e alfa, uma vez que, naquele momento, o anticorpo para a isoforma beta/delta não estava disponível no laboratório.

Visando compreender o papel dos receptores PPAR na neurotoxicidade induzida por drogas quimioterápicas, utilizamos o modelo *in vitro* de cultura primária de neurônios sensoriais. Este modelo tem sido utilizado para elucidar mecanismos fisiopatológicos de doenças que afetam o sistema nervoso periférico (MELLI e HÖKE, 2009). Em adição ao seu uso tradicional, estas culturas neuronais do GRD são aplicadas com êxito no estudo dos mecanismos de degeneração axonal em modelos de várias doenças (MELLI, *et al*., 2006; NGUYEN, *et al*., 2009).

Desta forma, foi estabelecido o protocolo de cultura de células de gânglio da raiz dorsal de ratos adultos, e os resultados obtidos por inspeção visual demonstraram que as culturas neuronais são viáveis quando mantidas em incubadora com 5% de CO2 à 37°C, por até 7 dias, como ilustrado na **Figura 7**. Em inspeção visual, após 24 horas de cultivo, foi observado que as células neuronais se aderiram à placa, bem como as células da glia. Ainda, outra observação importante quanto à viabilidade destas células relaciona-se à formação de processos a partir dos corpos neuronais, os quais são dependentes do tempo e das condições de cultivo. Uma vez estabelecido o protocolo, avaliamos o efeito da cisplatina sobre a expressão de receptores PPARγ em amostras da cultura.

No presente trabalho, escolhemos começar com a avaliação do PPARγ, dado que resultados publicados na literatura demonstram que este possui função neuroprotetora em muitos processos degenerativos, isquêmicos, ou inflamatórios, os quais conduzem à morte neuronal, através da inibição de macrófagos e a ativação microglial, células

responsáveis pela produção de moléculas neurotóxicas (KIELIAN e DREW, 2003). Ainda, agonistas destes receptores possuem efeitos sobre células do sistema imunológico periférico, a exemplo dos linfócitos T, inibindo assim a secreção de IL-2, atividade promissora em modelos de neurodegeneração (PADILLA, *et al*, 2000). Quanto às outras isoformas do receptor PPAR, estas serão testadas posteriormente.

A concentração de cisplatina utilizada em nossos experimentos foi baseada nos resultados apresentados por Jiang *et al.* (2008), que determinaram o efeito citotóxico da cisplatina em cultura primária de neurônios sensoriais. Estes autores avaliaram a viabilidade celular e a liberação do neuropeptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) após a exposição das culturas a diferentes concentrações de cisplatina por um período de 24 horas. Dentre as concentrações avaliadas, cisplatina 25 μM não reduziu a viabilidade celular, enquanto que na concentração de 400 μM, apenas 4±0,01% das células em cultura sobreviveram. Além disso, houve uma diminuição da liberação de CGRP nas concentrações de 10 e 30 μM. Desta forma, a concentração de 30 μM de cisplatina foi utilizada neste trabalho, já que a mesma alterou a resposta fisiológica dos neurônios sensoriais (liberação de CGRP) sem induzir morte celular.

Com base no exposto, para avaliar se o tratamento com drogas antineoplásicas alteraria a expressão de PPAR em cultura primária de neurônios sensoriais, as células foram submetidas ao tratamento com cisplatina (30μM) ou controle (Salina 0,9%) durante 24h. Nossos resultados demonstraram que a cisplatina não alterou a expressão de PPARγ, quando comparado ao grupo controle salina, em um período de 24 horas (cisplatina 50.82 ± 6.962 e salina 62.80 ± 21.77), como pode ser observado na **Figura 8.**

Por outro lado, a partir de uma linhagem celular humana de adenocarcinoma pulmonar, Reddy *et al.* (2008) verificaram que a exposição destas células à cisplatina promoveu um aumento da expressão de PPARγ, dose dependente, avaliado por Western blot. Na sequência, mostraram que a ativação deste receptor resulta na potencialização do efeito da cisplatina, dado pela inibição do crescimento das células testadas. Este

achado demonstra um provável papel sinérgico específico entre ligantes de PPARγ e agentes quimioterápicos.

Contudo, esta disparidade entre os resultados obtidos no presente trabalho e os apresentados por Reddy *et al.* (2008) podem refletir possíveis diferenças nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos modelos de neuropatia induzidos por lesão ou por quimioterapia, tendo em vista que, para a realização dos testes, foram utilizados diferentes tipos de linhagens celulares, tais como células neuronais e células de adenocarcinoma pulmonar humano, respectivamente.

Corroborando nossa hipótese de que a ativação dos receptores PPAR pode ser protetora na neuropatia induzida por quimioterápicos, recentemente Zanardelli *et al*. (2014) mostraram em modelo de cultura de astrócitos que a neurotoxicidade induzida por oxaliplatina, um quimioterápico análogo à cisplatina, altera a funcionalidade do peroxissoma, organela responsável pelo balanço redox celular. Além disso, a ativação do PPARγ ainda atenua a hiperalgesia induzida pela administração sistêmica de oxaliplatina.

Os dados apresentados no presente trabalho estendem as informações da literatura, apontando o papel neuroprotetor dos receptores PPARγ em modelos de NPIQ. Neste sentido, tendo em vista que o tratamento com cisplatina não alterou a expressão do receptor PPARγ, torna-se viável a realização de futuros experimentos que avaliem o papel desta família de receptores, frente o uso de agonistas, em modelos *in vitro* de neuropatia periférica induzida por quimioterápicos.

Vale ressaltar ainda que, embora o mecanismo de ação das diversas classes de drogas utilizadas para tratar o câncer seja diferente, pacientes diagnosticados com neuropatia periférica usualmente apresentam sintomas similares. Assim, é possível que a neurotoxicidade induzida por diferentes agentes seja causada pelos mesmos mecanismos.

7. CONCLUSÃO

O estabelecimento da cultura de neurônios sensoriais é uma ferramenta de extrema importância para análise da neurotoxicidade induzida por quimioterápicos. Este modelo *in vitro* representa um sistema controlado em que é possível estudar vias de sinalização intracelulares envolvidas nas alterações de expressão de proteínas e neurotransmissores, bem como degeneração axonal. Além disso, a expressão de PPARγ/α em neurônios sensoriais demonstra que a hipótese de ativação destes receptores com o objetivo de produzir neuroproteção é plausível. Desta forma, estes resultados podem colaborar para futuros experimentos de ativação/inibição desta via de sinalização e seu efeito na neurotoxicidade induzida por quimioterápicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGYRIOU, A. A., *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity (CIPN): an update. Crit Rev Oncol Hematol. 2012 Apr. 82(1):51-77.

ARGYRIOU, A. A., *et al*. Toxic peripheral neuropathy associated with commonly used chemotherapeutic agents. J BUON. 2010. 15(3): 435- 46.

BARRA, G., *et al*. Molecular mechanism of thyroid hormone action. Arq Bras Endocrinol Metabolism. 2004 Feb; 48(1):25-39.

BECK, D. J., BRUBAKER, R. R. Effect of cis-platinum(II)diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair deficient mutants of Escherichia coli. J.Bacteriol. 1973. 116, 1247- 1252.

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

BOULIKAS, T., *et al*. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. Cancer Ther. 2007. 5:537–583.

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

BRAISSANT, O., WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. Endocrinology. 1998. 139, 2748– 2754.

BURGESS, G., WILLIAMS, D. The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. J. Clin. Invest. 2010.120: 3753-9.

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

CHAWLA, A., *et al.* Peroxisome proliferatoractivated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. Endocrinology 1994. 135:798– 800.

D'AGOSTINO G., *et al*. Central administration of palmitoylethanolamide reduces hyperalgesia in mice via inhibition of NF-kappaB nuclear signalling in dorsal root ganglia. Eur J Pharmacol. 2009 Jun 24. 613(1-3):54-9.

DELERIVE, P., *et al.* Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. J Biol Chem. 2000 Nov 24. 275(47):36703-7.

DESVERGNE, B., WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev. 1999 Oct. 20(5):649-88.

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

ELJACK, N. D., *et al.* Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. Metallomics. 2014 Nov;6(11):2126-33.

FLATTERS, S. J., *et al*. Acetyl-L-carnitine prevents and reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. Neuroscience Letters. 2006. 397, 219–223.

FRAVAL, H. N., RAWLINGS, C. J., ROBERTS, J. J. Increased sensitivity of UV-repair-deficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymine dimers are not recognized by an endonuclease extracted from Micrococcus luteus. Mutat.Res.1978. 51, 121- 132.

FREITAG, C. M., MILLER, R. J. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists modulate neuropathic pain: a link to chemokines? Front Cell Neurosci. 2014 Aug. 20; 8:238.

GERMAIN, P., *et al*. Overview of nomenclature of nuclear receptors. Pharmacol Rev 2006. 58 (4): 685-704.

GRANNEMAN, J., SKOFF, R., YANG, X. Member of the peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. J. Neurosci. 1998. Res. 51, 563–573.

GRONEMEYER, H., GUSTAFSSON, J. A., LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. Nat Rev Drug Discov 2004. 3 (11): 950-64.

HAMMACK, J. E. *et al.* Phase III evaluation of nortriptyline for alleviation of symptoms of cis-platinum-induced peripheral neuropathy. Pain. 2002. 98: 195-203.

JAMIESON, E. R., LIPPARD, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. Chem Rev. 1999 Sep 8;99(9):2467-98.

JIANG, Y., *et al*. Implications of apurinic/apyrimidinic endonuclease in reactive oxygen signaling response after cisplatin treatment of dorsal root ganglion neurons. Cancer Res. 2008 Aug. 1;68(15):6425-34.

KALEY, T. J., DEANGELIS, L. M. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Br J Haematol. 2009 Apr. 145(1):3-14.

KAUTIO, A. L. *et al*. Amitriptyline in the treatment of chemotherapy-induced neuropathic symptoms. J. Pain Symptom Manage. 2008. 35:31-9.

KIELIAN, T., DREW, P.D. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists on central nervous system inflammation. J Neurosci Res. 2003 Feb 1. 71(3):315-25.

KLIEWER, S. A., *et al*. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. Proc Natl Acad Sci USA 1994. 91:7355–9.

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

LOVERME, J., *et al*. Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. J Pharmacol Exp Ther. 2006 Dec. 319(3):1051-61.

LOVETT-RACKE, A. E., *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists as therapy for autoimmune disease. J Immunol. 2004 May. 1;172(9):5790-8.

LÜSCHER, C., *et al*. G protein-coupled inwardly rectifying K+ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. Neuron. 1997 Sep;19(3):687-95.

MAEDA, T., *et al*. Pioglitazone attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia in mice subjected to peripheral nerve injury. J Pharmacol Sci. 2008 Nov. 108(3):341-7.

MARKER, C. L., *et al.* Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. J Neurosci. 2005 Apr 6;25(14):3551-9.

MARX, N., *et al*. PPAR alpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. Circulation. 1999 Jun. 22;99(24):3125-31.

MCDONALD, E. S., *et al*. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity.Neurobiol Dis. 2005 Mar. 18(2):305-13.

MELLI, G., HÖKE, A. Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. Expert Opin Drug Discov. 2009 Oct. 1;4(10):1035-1045.

MELLI, G., *et al.* Spatially distinct and functionally independent mechanisms of axonal degeneration in a model of HIV-associated sensory neuropathy. Brain. 2006. 129.

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

NGUYEN, T., *et al*. Axonal protective effects of the myelin-associated glycoprotein. J Neurosci. 2009. 29(3):630.

O'CONNOR, A. B., DWORKIN, R. H. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. Am J Med. 2009 Oct. 122(10 Suppl):S22-32.

PADILLA, J., *et al*. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. J Immunol. 2000 Dec 15. 165(12):6941-8.

PAHAN, K., *et al*. Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, inhibits the induction of nitric-oxide synthase in human astrocytes. J Biol Chem. 2002 Nov. 29;277(48):45984-91.

PETERS, C. M., *et al*. Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. Exp Neurol. 2007 Jan. 203(1):42-54.

PISANO, C., *et al*. Paclitaxel and Cisplatin-induced neurotoxicity: a protective role of acetyl-L-carnitine. Clin Cancer Res. 2003. Nov. 15;9(15):5756-67.

PODRATZ, J. L., *et al*. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. Neurobiol Dis. 2011 Mar. 41(3):661-8.

POLAK, P. E., *et al.* Protective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta agonist in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol. 2005 Nov. 168(1-2):65-75.

REDDY, R. C., *et al*. Chemotherapeutic drugs induce PPAR-gamma expression and show sequence-specific synergy with PPAR-gamma ligands in inhibition of non-small cell lung cancer. Neoplasia. 2008. 10:597–603.

RIBEIRO, R. C., KUSHNER, P. J., BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. Annu Rev Med. 1995. 46:443-53.

RIZZO, G., FIORUCCI, S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. Curr Opin Pharm 2006. 6:421–7.

ROBINSON-RECHAVI, M., GARCIA, H. E., LAUDET, V. The nuclear receptor superfamily. J Cell Sci. 2003 Feb. 15;116(Pt 4):585-6.

SIMONSEN, H., *et al.* Evaluation of neurotoxicity data: A methodological approach to classification of neurotoxic chemicals. Scand J Work Environ Health. 1994. 20:1-12.

SONODA, J., PEI, L., EVANS, R. M. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. FEBS Lett 2008. 582 (1): 2-9.

STAELS, B., *et al.* Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARa but not by PPARg activators. Nature (London) 1998. 393: 790–793.

STEINMETZ, A. C., RENAUD, J. P., MORAS, D. Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2001. 30:329-59.

STUBBLEFIELD, M. D., *et al*. NCCN task force report: management of neuropathy in cancer. J Natl Compr Canc Netw. 2009. (5): 1- 26.

TA, L. E., *et al*. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding.Neurotoxicology. 2006 Dec. 27(6):992-1002.

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 (PPARγ): 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 Jan. 28(1):49-58.

VIVOSKY, C., *et al*. Putting evidence into practice: evidencebasedinterventions for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Clin J Oncol Nurs. 2007. (6): 901- 13.

WINDEBANK, A. J. Chemotherapeutic neuropathy. Curr Opin Neurol. 1999 Oct. 12(5):565-71.

WOOLF, C. J., SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. Science. 2000. 288: 1765-69.

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. Pain. 2011. 152(3 Suppl): S2-15.

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

WOYNAROWSKI, J. M., *et al*. Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. Mol Pharmacol. 1998 Nov. 54(5):770-7.

ZANARDELLI, M., *et al*. Oxaliplatin Neurotoxicity Involves Peroxisome Alterations. PPAR gamma Agonism as Preventive Pharmacological Approach. Plos One. 2014 July. 9(7).

ANEXO

- **Processo de análise do projeto de pesquisa.**

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

Brasília, 1º de julho de 2013.

DECLARAÇÃO

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

Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA

...