

HENRIQUE RODRIGUES DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR DE EXTRATO
AQUOSO DE *Eugenia dysenterica* DC EM MODELO DE NEUROPATIA
PERIFÉRICA INDUZIDA POR CISPLATINA *in vitro*

BRASÍLIA,
2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

HENRIQUE RODRIGUES DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR DE EXTRATO
AQUOSO DE *Eugenia dysenterica* DC EM MODELO DE NEUROPATIA
PERIFÉRICA INDUZIDA POR CISPLATINA *in vitro*

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção de título de Doutor em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Dr. Francisco de Assis Rocha
Neves

Co-orientadora: Dra. Djane Braz Duarte

Brasília,
2022

HENRIQUE RODRIGUES DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR DE EXTRATO
AQUOSO DE *Eugenia dysenterica* DC EM MODELO DE NEUROPATIA
PERIFÉRICA INDUZIDA POR CISPLATINA *in vitro*

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção de título de Doutor em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Francisco de Assis Rocha Neves
Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília

Djane Braz Duarte
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

Joice Maria da Cunha
Departamento de Farmacologia – Universidade Federal do Paraná

Fernanda Regina de Castro Almeida
Departamento de Bioquímica e Farmacologia - Universidade Federal do Piauí

Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília

Dayde Lane Mendonça da Silva
Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília

Dedico este trabalho à eterna girafinha (meu vô Nino), à eterna raposa (meu vô Chico), meu tio Bené e minha tia Teté. Vocês para sempre serão lembrados com imenso amor e carinho. Obrigado por terem existido e feito a diferença!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido o dom da vida e por me permitir ter a experiência de vivê-la. Obrigado por me permitir realizar meus sonhos.

Aos meus pais, Angelice e Zildevan, e à minha irmã Lílian, que sempre presentes, me incentivam a seguir meus desejos, que com amor apoiam minhas decisões e me dão suporte em todos os momentos da minha vida. Que me encorajam a continuar, mesmo quando parar não é possibilidade. Obrigado por tudo! Espero que alguns dos seus sonhos sejam realizados através de mim.

À minha segunda família, Neide, Joaquim, Letícia e Daniel, que oferecem e me dão ajuda, mesmo quando não sei que dessa preciso.

À Djane, que de uma forma rígida (muito) e doce, me apresentou e consolidou a ciência. Que me questionou, desafiou, incentivou e, sobretudo, que me ensinou. Muito obrigado por estar sempre do lado, por ter vibrado nas minhas conquistas e me dado suporte em momentos complicadíssimos que jamais imaginei passar. Sou realmente feliz por ser orientado pela melhor! Aqui não será mais “professora Djane”, pois me dei a liberdade de considera-la muito mais do que isso.

Ao professor Francisco, que me deu todo o suporte que precisei para a realização desse trabalho. Muito obrigado por me abrir diversas portas e me incentivar a atravessá-las.

To Dr. Fehrenbacher, Eric and Adib. A special thank you for being the best hosts that I could have. Thank you for being so patient, for the lessons, for presenting me your work and ideas, and for allowing me to realize that I am in the right place every day. Thank you, guys. I'll never forget it!

À minha banca examinadora completamente estrogênica: às Professoras Dras. Joice Maria da Cunha, Fernanda Regina de Castro Almeida, Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza e Dayde Lane Mendonça da Silva, que tão prontamente aceitaram compô-la. Obrigado por doar seus tempos para engrandecer esse trabalho.

Aos meus “amigos dos EUA” Léo e Tati. Como foi um refrigério tê-los na minha vida num momento tão delicado (Brasil 2020 + COVID-19 longe de ‘casa’). Como foi bom partilhar as angústias, felicidades e comida com vocês. “Engraçado” como a minha vida foi mais fácil por conta de vocês!

À Gleice, que é minha amiga de infância descoberta na vida adulta. É tão bom conversar contigo, rir de tudo que a gente reclama e reclamar de tudo que a gente ri.

Dividir experiências e ser o suporte quando um de nós precisa. Quantos “a gente precisa se falar” falamos e realmente precisávamos? Esse doutorado foi mais leve por sua causa. Esse agradecimento também se estende para a Anna, que desde a graduação foi companheira, amiga e pau para toda obra. Eu tenho muito orgulho de vocês.

Aos amigos que colhi nessa jornada, que sempre oferecem palavras amigas, de incentivo e de carinho. Que em muitas vezes nem sabem o que faço ou preciso, mas acreditam que eu vou conseguir. Que me fazem refletir, que me fazem descobrir e que me fazem concluir. Muito obrigado Alliny, Bel, Cinthia, Daniella, Denyse, Gabriel, Mariella, Natane, Samara e Victor. Eu tenho os melhores amigos. Obrigado gente, pois vocês foram essenciais na minha vida.

À galera do Farmol, que discutindo ciência da forma mais descontraída possível, fazia o tempo de trabalho ser breve. Vocês são aquela mescla de colegas de trabalho com amigos. Obrigado Carol Lourenço, Carol Martins, Fernanda, Isadora, Kaian, Natália e Simone.

Às professoras Lorena e Ingrid, que quando precisei de ajuda, fui prontamente contemplado. Esse trabalho existe também por sua causa.

À professora Pérola, que em parceria científica, nos forneceu um dos instrumentos de trabalho para a realização deste, o extrato de *Eugenia dysenterica*, uma planta espetacular.

Aos integrantes do grupo ao qual pertenço: Ellen, Paulo, Vanessa, Andressa. É sempre bom estar com vocês.

À minha enorme família. Vocês são demais. Eu espero estar à altura daquilo que vocês esperam de mim. Eu quero ser o exemplo de que as coisas dão certo.

Obrigado à CAPES, agência financiadora me concedeu a minha bolsa de estudos no Brasil e nos EUA.

A todos aqueles que sempre torceram pelo meu sucesso!

Vamos remar contra a corrente
Desafinar do coro dos contentes
(Humberto Gessinger)

RESUMO

A neuropatia periférica induzida por quimioterápicos (NPIQ) é uma manifestação clínica de diversas classes de fármacos antitumorais, tais como os derivados da platina. A cisplatina é um antitumoral bastante utilizado na prática oncológica devido à sua capacidade de induzir apoptose nas células tumorais em decorrência da formação de adutos de platina no DNA. Entretanto, nos neurônios, a cisplatina induz alterações que culminarão na neuropatia periférica (NP), um conjunto de sintomas caracterizado por ser predominantemente sensorial e dose-dependente. Dentre esses sintomas está a parestesia, perda sensorial e dor neuropática, que ainda pode ser aguda ou crônica. Esses efeitos ocorrem porque os neurônios dos gânglios das raízes dorsais (GRDs) também são alvos desses fármacos. Visto isso, desenvolver estratégias que visem proteger o sistema nervoso é fundamental para o tratamento da NPIQ. Assim, a proposta desse trabalho é avaliar *in vitro* se extrato aquoso de folhas da *Eugenia dysenterica* (planta do Cerrado popularmente conhecida como Cagaita) possui papel neuroprotetor no modelo de NPIQ, devido às atividades antioxidante e anti-inflamatória dessa planta, além de efeito neuroprotetor já demonstrado em outros modelos de neurotoxicidade. Assim, foram estabelecidas culturas primárias de células de GRDs de ratos adultos e de células *neuron-like* PC-12, que foram tratadas com extrato de *E. dysenterica* na presença ou ausência de cisplatina. Os efeitos desses tratamentos sobre a neurotoxicidade da cisplatina foram analisados por intermédio das técnicas de avaliação da viabilidade celular, quantificação da liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e quantificação de CGRP total, quantificação de mRNA para Superóxido dismutase 2 (SOD-2) e NRF2, da liberação de Interleucina-1 β (IL-1 β), da síntese de espécies reativas de oxigênio e mensuração do comprimento de neuritos. Observamos que o tratamento com 30 μ M de cisplatina por 24 horas não induziu morte celular de células de GRDs ($p < 0,05$), aumentou a sensibilização neuronal em 53,9% após estímulo com capsaicina e 33,3% após estímulo com KCl ($p < 0,05$) e induziu estresse oxidativo em células PC-12 (aumento de 57,1% - $p < 0,05$), que foram prevenidos pelo pré-tratamento com 30 μ g/mL do extrato de *E. dysenterica* ($p < 0,05$). Além disso, observamos que a cisplatina promove o aumento da liberação de IL-1 β em diferentes tempos e concentrações ($p < 0,05$), síntese gênica de SOD-2 (aumento de 162,1% - $p < 0,05$) e inibição do crescimento de neuritos (18,0% - $p < 0,05$). Já o tratamento somente com 30 μ g/mL do extrato de *E. dysenterica* também não altera a viabilidade celular de células GRDs, liberação de IL-1 β e a expressão gênica de SOD-2 ($p < 0,05$), entretanto reduz essa expressão de Nrf2 (65,6% - $p < 0,05$). Além disso, observamos que o extrato não interfere na atividade antitumoral ou no efeito em neuritos da cisplatina ($p < 0,05$). Também observamos que os ativadores da via Nrf2/Keap1/ARE, oltipraz e sulforafano, induziram sensibilização neuronal. Após estímulo com capsaicina, 24 horas de tratamento com 50 μ M de oltipraz aumentou a liberação de

CGRP em 185,1% e 100 μ M em 257,9%, já o sulforafano aumentou em 110,9% (10 μ M) e 150,5% (20 μ M) tal liberação ($p < 0,05$). Em suma, nossos dados demonstram que o extrato de *E. dysenterica* pode ser uma promissora ferramenta para o tratamento da NP induzida pela cisplatina.

Comissão de Ética de Uso de Animais: Universidade de Brasília - protocolos 51793/2014 e 23106.106926/2021-68.

Palavras-chave: Neuropatia periférica induzida por quimioterápicos; cisplatina; neuroproteção; estresse oxidativo; CGRP; IL-1 β ; *Eugenia dysenterica*.

ABSTRACT

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a clinical manifestation of several classes of antitumor drugs, such as platinum derivatives. Cisplatin is an antitumor widely used in oncology practice due to its ability to induce apoptosis in tumor cells as a result of the formation of platinum adducts in DNA. However, in neurons, cisplatin induces changes that will culminate in peripheral neuropathy (PN), a set of symptoms characterized by being predominantly sensory and dose-dependent. Among these symptoms are paresthesia, sensory loss and neuropathic pain, which can still be acute or chronic. These effects occur because dorsal root ganglia (DRG) neurons are also targets of these drugs. Given this, developing strategies aimed at protecting the nervous system is essential for CIPN treatment. Thus, the purpose of this work is to evaluate *in vitro* whether aqueous extract of *Eugenia dysenterica* leaves (Cerrado plant popularly known as Cagaita) has a neuroprotective role in the CIPN model, due to the antioxidant and anti-inflammatory activities of this plant, in addition to its neuroprotective effect, already demonstrated in other neurotoxicity models. Thus, primary cultures of DRG cells from adult rats and neuron-like PC-12 cells were established, which were treated with *E. dysenterica* extract in the presence or absence of cisplatin. The effects of these treatments on cisplatin neurotoxicity were analyzed using the techniques of evaluating cell viability, quantification of calcitonin gene-related peptide (CGRP) release and quantification of total CGRP, quantification of mRNA for Superoxide dismutase 2 (SOD-2) and NRF2, the release of Interleukin-1 β (IL-1 β), the synthesis of reactive oxygen species and measurement of neurite length. We observed that treatment with 30 μ M cisplatin for 24 hours did not induce cell death of DRG cells ($p < 0.05$), increased neuronal sensitization in 53.9% after capsaicin stimulus and 33.3% after KCl stimulus ($p < 0.05$) and induced oxidative stress in PC-12 cells (increase of 57.1% - $p < 0.05$), which were prevented by pretreatment with 30 μ g/mL *E. dysenterica* extract ($p < 0.05$). Thus, we observed that cisplatin promotes an increase of IL-1 β release in different times and concentrations ($p < 0.05$), SOD-2 gene synthesis (increase of 162.1% - $p < 0.05$) and inhibition of neurite outgrowth (18.0% - $p < 0.05$). On the other hand, the treatment with only 30 μ g/mL *E. dysenterica* do not alters the DRG cell viability, IL-1 β release and SOD-2 gene expression ($p < 0.05$), however reduces that NRF2 expression (65.6% - $p < 0.05$). Furthermore, we observed that the extract does not interfere with the antitumor activity or the effect of cisplatin on neurites ($p < 0.05$). We also observed that Nrf2/Keap1/ARE pathway activators, oltipraz and sulforaphane, induced neuronal sensitization. After capsaicin stimulus, treatment with oltipraz 50 μ M for 24 hours increased 185.1% the CGRP release and 100 μ M increased 257.9%, on the other hand, sulforaphane increased 110.9% (10 μ M) and 150.5% (20 μ M) such release ($p < 0.05$). In summary, our data demonstrate that *E. dysenterica* extract can be a promising tool for the treatment of cisplatin-induced PN.

Animal Use Ethics Commission: University of Brasília - protocols 51793/2014 and 23106.106926/2021-68

Keywords: Chemotherapy-induced peripheral neuropathy; cisplatin; neuroprotection; CRRP; IL-1 β ; *Eugenia dysenterica*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Localização dos gânglios das raízes dorsais
- Figura 2 Formação de espécies reativas de oxigênio
- Figura 3 Representação esquemática da ativação da via Nrf2/Keap1/ARE
- Figura 4 *E. dysenterica* e seus frutos
- Figura 5 Viabilidade celular da cultura primária de células de GRDs tratada com extrato de *E. dysenterica*
- Figura 6 O extrato de *E. dysenterica* não altera a atividade antitumoral da cisplatina em cultura de células A549
- Figura 7 Cisplatina induz resposta dual em relação a liberação de CGRP em cultura primária de células de GRDs estimulada com capsaicina.
- Figura 8 O extrato de *E. dysenterica* reduz a liberação de CGRP sem alterar sua quantidade total em cultura primária de células de GRDs estimulada com capsaicina.
- Figura 9 O extrato de *E. dysenterica* reduz a liberação de CGRP sem alterar sua quantidade total em cultura primária de células de GRDs estimulada com KCl
- Figura 10 Determinação da liberação de CGRP induzida pelo pré-tratamento com extrato de *E. dysenterica* seguido do tratamento com cisplatina em cultura primária de células de GRDs estimulada com capsaicina.
- Figura 11 O extrato de *E. dysenterica* previne o aumento da liberação de CGRP induzida pela cisplatina sem alterar sua quantidade total em cultura primária de células de GRDs estimulada com capsaicina de maneira dependente de tempo
- Figura 12 O extrato de *E. dysenterica* previne o aumento da liberação de CGRP induzida pela cisplatina em cultura primária de células de GRDs estimulada com capsaicina
- Figura 13 O extrato de *E. dysenterica* reduz o aumento da liberação de CGRP induzida pela cisplatina sem alterar sua quantidade total em cultura primária de células de GRDs estimulada com KCl.
- Figura 14 Curvas de tempo-resposta na liberação de IL-1 β de cultura primária de células de GRDs após o tratamento com cisplatina

- Figura 15 Curva de concentração-efeito na liberação de IL-1 β de cultura primária de células de GRDs após o tratamento com extrato de *E. dysenterica*.
- Figura 16 Concentração de EROs liberadas de cultura primária de células de GRDs após o tratamento com cisplatina e mensuradas por EPR.
- Figura 17 Concentração de EROs liberadas de cultura primária de células de GRDs após o tratamento com cisplatina em KHB e mensuradas por EPR.
- Figura 18 Fluorescência do DCF fluorescente em cultura de células PC-12 diferenciadas após o tratamento com cisplatina e extrato de *E. dysenterica*
- Figura 19 Fluorescência do DCF fluorescente em cultura de células PC-12 diferenciadas após o cotratamento com cisplatina e extrato de *E. dysenterica*
- Figura 20 Especificidade e eficiência dos pares de primers de SOD-2 e NRF2
- Figura 21 Expressão de RNAm de SOD-2 e NRF2 em culturas primárias de células de GRDs após o tratamento com cisplatina
- Figura 22 Expressão de RNAm de SOD-2 e NRF2 em culturas primárias de células GRDs após o tratamento com extrato de *E. dysenterica*
- Figura 23 Os ativadores da via Nrf2/Keap1/ARE oltipraz e sulforafano aumentam a liberação de CGRP em cultura primária de células de GRDs estimulada com capsaicina, sem alterar o seu conteúdo total
- Figura 24 Fotomicrografia de fase em microscópio invertido das culturas de células PC-12 diferenciadas
- Figura 25 Quantificação de neuritos de células PC-12 diferenciadas após o tratamento com cisplatina e extrato de *E. dysenterica*

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Reagentes utilizados por reação nos experimentos de RT-PCRq
- Quadro 2 Eficiência relativa, inclinação da curva-padrão e r^2 dos pares de *primers*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -actina	Beta-actina
ARE	Elemento de resposta antioxidante, em inglês: <i>antioxidant response element</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, em inglês: <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
Cpm	Contagem por minuto
Ct	Ciclo limiar, do inglês: <i>Cicle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
GRD	Gânglio da raiz dorsal
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
I ¹²⁵	Iodo ¹²⁵
I ¹²⁵ CGRP	CGRP marcado com o radioisótopo Iodo ¹²⁵
IL-1 β	Interleucina 1 β
Keap1	<i>Kelch-like ECH associated protein 1</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
NFkB	Fator nuclear k B
NP	Neuropatia periférica
NPIQ	Neuropatia periférica induzida por quimioterápicos
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2 related factor 2</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Par de base
PBS	Tampão fosfato salino, em inglês: <i>Phosphate-buffered saline</i>

Q.s.p.	Quantidade suficiente para
RIA	Radioimunoensaio, em inglês: <i>Radioimmunoassay</i>
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNase	Ribonuclease
RT	Transcrição Reversa, do inglês: <i>Reverse transcription</i>
RT-PCR _q	Transcrição Reversa seguida pela Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa, do inglês: <i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
Rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD-2	Superóxido dismutase 2
TA	Temperatura ambiente
UV	Ultravioleta
TNF- α	Fator de necrose tumoral α , do inglês: <i>Tumor necrosis factor α</i>

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS	20
1.2.	MECANISMOS DA NPIQ	22
1.3.	ESTRESSE OXIDATIVO E NPIQ	26
1.3.1.	Mecanismos de controle de EROs: via Nrf2/Keap1/ARE	27
1.4.	NEUROPROTEÇÃO	29
1.5.	<i>Eugenia dysenterica</i> DC: POTENCIAL NEUROPROTETOR	29
2.	OBJETIVOS	34
2.1.	OBJETIVO GERAL	34
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3.	MATERIAIS E METODOS	36
3.1.	ANIMAIS	36
3.2.	REAGENTES	36
3.3.	OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE <i>E. dysenterica</i>	37
3.4.	CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DOS GÂNGLIOS DAS RAÍZES DORSAIS	37
3.5.	CULTURA DE CÉLULAS A549	39
3.6.	CULTURA DE CÉLULAS PC-12	39
3.7.	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELA EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPANO	40
3.8.	ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE CGRP	40
3.8.1.	Coleta das amostras	41
3.8.2.	Radioimunoensaio (RIA)	42
3.8.3.	Adsorção com carvão ativado e análise	43
3.9.	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY – ELISA	43
3.10.	EXPRESSÃO GÊNICA	45
3.10.1.	Obtenção dos <i>primers</i>	46
3.10.2.	Validação dos <i>primers</i>	47
3.10.3.	Análise da expressão gênica por RT-PCRq	48
3.11.	QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	49
3.11.1.	Mensuração de EROs por EPR	50

3.11.2.	Mensuração de EROs por fluorimetria	51
3.12.	DIFERENCIAÇÃO CELULAR E ANÁLISE DE NEURITOS	52
3.13.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	52
3.14.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4.	RESULTADOS	54
4.1.	O EXTRATO DE <i>E. dysenterica</i> NÃO ALTERA A VIABILIDADE CELULAR EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS DE GRDs	54
4.2.	O EXTRATO DE <i>E. dysenterica</i> NÃO ALTERA O EFEITO ANTITUMORAL DA CISPLATINA EM CÉLULAS A549	55
4.3.	A CISPLATINA POSSUI EFEITO DUAL SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs	57
4.4.	O EXTRATO DE <i>E. dysenterica</i> INDUZ DIMINUIÇÃO DA LIBERAÇÃO DE CGRP EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs	59
4.5.	O EXTRATO DE <i>E. dysenterica</i> PREVINE OS EFEITOS NEUROTÓXICOS DA CISPLATINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs E ESTE EFEITO É DEPENDENTE DE TEMPO	63
4.6.	O TRATAMENTO COM CISPLATINA INDUZ AUMENTO DA LIBERAÇÃO DE IL-1 β DE FORMA TEMPO-DEPENDENTE	70
4.7.	A CISPLATINA INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO, QUE É PREVENIDO PELO PRÉ-TRATAMENTO COM EXTRATO DE <i>E. dysenterica</i>	72
4.8.	VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA RT-PCRq EM TEMPO REAL	78
4.9.	A CISPLATINA AUMENTA A EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDATIVOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs	80
4.10.	ATIVADORES DA VIA NRF2/KEAP1/ARE INDUZEM AUMENTO DA RESPOSTA À CAPSAICINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs	82
4.11.	O EXTRATO DE <i>E. dysenterica</i> NÃO MODULA A REDUÇÃO DA NEURITOGÊNESE INDUZIDA PELA CISPLATINA EM CÉLULAS PC-12 DIFERENCIADAS	85
5.	DISCUSSÃO	87
6.	CONCLUSÃO	104
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

8.	ANEXOS	131
8.1.	ANEXO 1 – CERTIFICADOS DA CEUA.....	131
8.2.	ANEXO 2 – CARTA À COMUNIDADE	133

1. INTRODUÇÃO

1.1. NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICOS

O câncer compreende um conjunto com mais de 100 diferentes tipos de doenças, que possuem como característica comum o crescimento desordenado de células, com propensão à metástase (INCA, 2020). Hoje, sabemos que o câncer já aflige a humanidade a mais de 3000 mil anos, e atualmente é considerado um problema de saúde global. No Brasil a estimativa do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é que em cada ano do triênio 2023-2025 sejam esperados 704.000 novos casos de câncer (INCA, 2022). Quanto ao seu tratamento, existem diversas abordagens, são elas: remoção cirúrgica, transplante de medula óssea, radioterapia e quimioterapia. Essa última é uma das abordagens mais utilizadas, entretanto, seu uso induz efeitos adversos importantes, tais como a neurotoxicidade.

A toxicidade do sistema nervoso (SN) é o efeito adverso mais comum que ocorre durante o tratamento quimioterápico, e diversas classes de fármacos antitumorais induzem tal efeito, incluindo os derivados da platina (cisplatina, oxaliplatina e carboplatina), os fármacos modificadores da dinâmica dos microtúbulos (taxanos – paclitaxel e docetaxel; e os alcaloides da vinca), inibidor do proteassoma (bortezomib), e inibidor da angiogênese (talidomida - CVALETTI, MARMIROLI, 2010; STAROBOVA e VETTER, 2017; HU *et al.*, 2019). Esse efeito adverso recebe especial atenção na prática clínica principalmente devido à sua severidade e frequência. Observa-se que, além de uma alta incidência, em que manifestações neurotóxicas ocorrem em cerca de 20-40% dos pacientes, a neurotoxicidade ainda é preocupante por ser categorizada como dose-dependente, isto é, sua severidade aumenta de acordo com a progressão do tratamento quimioterápico (WOLF *et al.*, 2008; CVALETTI *et al.*, 2019).

Os sintomas neurotóxicos dos quimioterápicos se diferenciam a depender da região do SN afetada. Quando esses efeitos ocorrem no sistema nervoso central (SNC), há alteração da função cognitiva, caracterizando um fenômeno conhecido como “*chemobrain*” ou “*chemofog*”; porém, quando ocorre no sistema nervoso

periférico (SNP), é nomeada neuropatia periférica induzida por quimioterápicos (NPIQ - CAVALETTI e MARMIROLI, 2010; SIMÓ *et al.*, 2013), foco desse estudo.

Os sintomas observados na NPIQ são predominantemente sensoriais, e incluem entre outros, perda sensorial, parestesia e dor neuropática, sendo que essa última, pode ainda apresentar-se como aguda ou crônica (JAGGI; SINGH, 2012; PARK *et al.*, 2008). Tais sintomas, em conjunto, culminam não somente em uma terapia subótima, em que pode haver redução das doses terapêuticas ideais dos quimioterápicos, como também impactam direta e negativamente a qualidade de vida dos pacientes, inclusive, podem reduzir adesão ao tratamento (CAVALETTI *et al.*, 1992; CAVALETTI, *et al.*, 2011; GLENDENNING *et al.*, 2010; MOLS *et al.*, 2014). Além disso, outro fator importante é a interrupção do tratamento quimioterápico antes da sua finalização (WINDEBANK e GRISOLD, 2008).

Ainda, é oportuno esclarecer sobre o estabelecimento e duração da NPIQ. Diferentes estudos mostram que em algumas classes de quimioterápicos, a NPIQ manifesta-se desde os primeiros ciclos de tratamento, como ocorre, por exemplo, no tratamento com os derivados da platina (MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOD, 2009). Além disso, esses sintomas podem perdurar por todo o tratamento antitumoral e cessarem após o final desse, no entanto, podem estabelecer-se por semanas, meses ou anos, se tornando dessa maneira, uma condição crônica.

Em uma revisão sistemática realizada em 2014 por Seretny e colaboradores, é possível observar a magnitude do impacto negativo que a NPIQ pode ter na vida dos pacientes. Os autores observaram que a prevalência da NPIQ foi de 68,1% no primeiro mês após a quimioterapia, 60,0% após 3 meses do final dos ciclos quimioterápicos e de 30,0% após 6 meses ou mais do final do tratamento antitumoral. Em uma revisão de literatura mais recente, Kerckhove e colaboradores (2017) verificaram que a prevalência geral da NPIQ, isto é, considerando todos os fármacos antitumorais neurotóxicos, é de 38,0%, mas no caso da oxaliplatina, a estimativa é que a incidência seja maior do que 90,0%. No caso da cisplatina, em um ensaio de longo prazo (aproximadamente 15 anos) foi observado que 28% dos pacientes com câncer de testículo e tratados com esse antitumoral desenvolviam neurotoxicidade crônica sintomática, sendo que 6% sofriam de polineuropatia incapacitante (STRUMBERG *et al.*, 2002).

Assim, entender a NPIQ e estudar/desenvolver tratamentos para este efeito adverso é de inegável importância, sobretudo, considerando a alta prevalência e

potencial cronificação dessa condição. Outro fator também importante a se considerar é que fármacos como os derivados da platina ainda possuem um efeito chamado de “*coasting*”, que é definido como a piora do quadro neurotóxico após a descontinuação do tratamento quimioterápico (LOMONACO *et al.*, 1992; STAROBOVA e VETTER, 2017).

Ainda é importante ressaltar que esses fármacos, mesmo quando administrados em esquema terapêutico monoterápico, são capazes de induzir neuropatia periférica, no entanto, em diversos tratamentos antitumorais há o uso de terapia antineoplásica combinada (AVAN *et al.*, 2015). Essa combinação de fármacos tem caráter sinérgico, não só nas suas ações antitumorais como também nos efeitos adversos, logo, a incidência da NPIQ pode aumentar. Associado a isso, o estilo de vida (ex.: consumo de álcool e estado nutricional) e comorbidades (ex.: diabetes *mellitus*) também são fatores de risco para a manifestação da NPIQ (HERSHMAN *et al.*, 2014; KRUKOWSKI *et al.*, 2015).

Outrossim, não existe tratamento para a NPIQ, seja ele preventivo ou curativo, uma vez que a NPIQ é uma condição que pode ser classificada como farmacorresistente, isto é, pouco responsiva ao tratamento farmacológico (SAŁAT 2020). Segundo o *Guideline* mais recente da Sociedade Americana de Oncologia Clínica, não há tratamento farmacológico para prevenir a NIPQ em adultos, e no caso de NPIQ já estabelecida com dor, a recomendação para o tratamento da dor é o uso de duloxetina (antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina), embora sua eficácia seja moderada, de acordo com estudos clínicos (LOPRINZI *et al.*, 2020). A urgência de se buscar alternativas para o tratamento da NPIQ, seja ele preventivo ou curativo, mostra-se presente pela análise das recomendações de tratamento, uma vez apenas que apenas duloxetina seja a recomendação da Sociedade Americana de Oncologia Clínica desde 2014 (HERSHMAN *et al.*, 2014).

1.2. MECANISMOS DA NPIQ E NEUROTOXICIDADE DA CISPLATINA

Atualmente, ainda não estão totalmente elucidados os mecanismos pelos quais os quimioterápicos induzem neuropatia periférica, porém, sabe-se que as estruturas do SNP mais afetadas são os gânglios das raízes dorsais (GRDs)

CAVALETTI *et al.*, 2011; JIMENEZ-ANDRADE *et al.*, 2008). Essas estruturas (figura 1) estão paralelas à medula espinhal e são compostas por diversos tipos celulares, como células não neuronais (Ex.: fibroblastos e glia) e os corpos celulares dos neurônios sensoriais (SUNDARARAJAN *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2016). Uma possível explicação para que os GRDs sejam um dos alvos dos quimioterápicos é a ausência da proteção da barreira hematoencefálica, bem como o fato dessas estruturas possuírem uma complexa vascularização (CAVALETTI *et al.*, 2011; JIMENEZ-ANDRADE *et al.*, 2008).

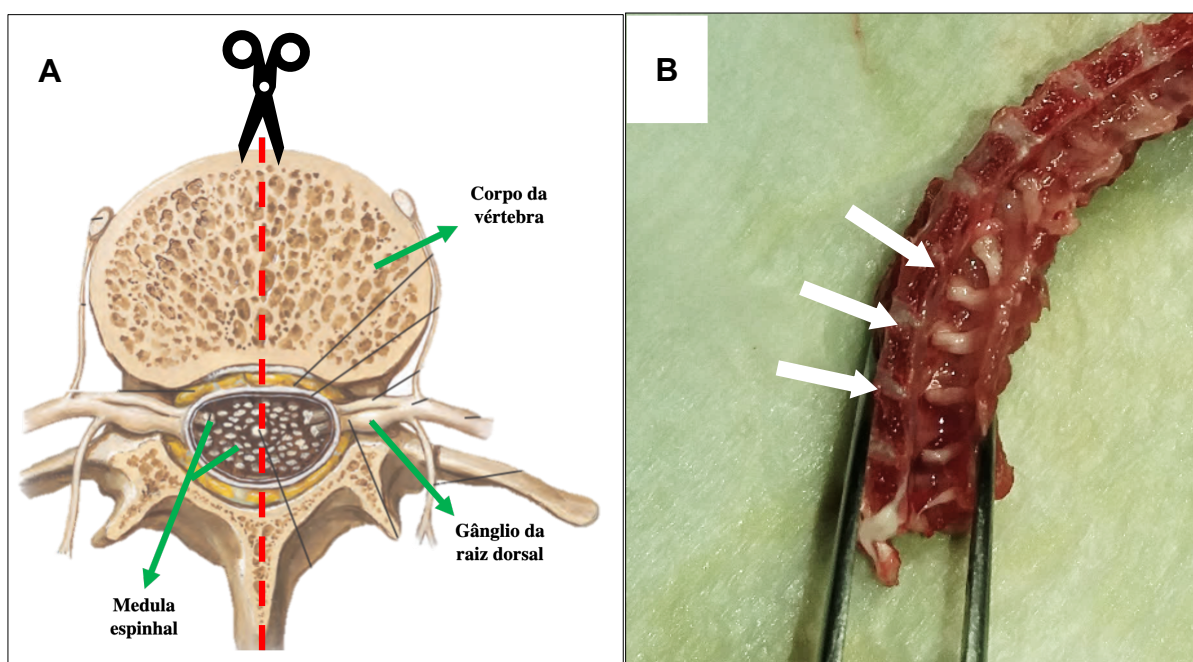


Figura 1. Localização dos gânglios das raízes dorsais. A. Representação de um corte transversal de vértebra lombar. Os GRDs localizam-se adjacentes à medula espinhal. Adaptado de NETTER, 2013. B. Fotografia de corte sagital da região cervical da coluna vertebral de rato. A medula espinhal e as meninges foram removidas para evidenciar os GRDs. As setas brancas apontam para os GRDs, ainda alojados em seus forames (autoria própria).

Especificamente em relação à cisplatina, quimioterápico usado nesse trabalho como fármaco indutor de NPIQ, há um maior acúmulo nos GRDs do que em outros tecidos neurais em comparação aos demais quimioterápicos neurotóxicos. Em ensaio realizado em ratos, onde a cisplatina foi administrada por via intraperitoneal, observou-se que as concentrações desse fármaco foram maiores nos GRDs do que na medula espinhal e no nervo isquiático (CAVALETTI *et al.*, 1990). Corroborando esse resultado, foi observado em estudo *postmortem* que em pacientes tratados com cisplatina, a concentração desse quimioterápico também foi maior nos GRDs do que na medula espinhal, raízes ventrais e dorsais e no lobo frontal (GREGG *et al.*, 1992).

A cisplatina é um antitumoral cuja atividade de inibição da divisão celular foi descrita pela primeira vez na década de 1965, em que foi avaliada a ação de campo elétrico sob cepas de *Escherichia coli* (ROSEMBERG *et al.*, 1965), o que iniciou o desenvolvimento de uma nova classe de medicamentos, os derivados da platina (ROSEMBERG *et al.*, 1969). A cisplatina é uma molécula formada por um átomo central de platina ligado à duas aminas e dois cloros. Uma vez em meio intracelular, se torna ativa, pois perde os cloros o que permite a ligação ao DNA, culminando na formação de adutos, que em última instância, inibe a replicação celular (HARDER E ROSENBERG, 1970; HOWLE E GALE, 1970).

Os quimioterápicos possuem diferentes mecanismos de ação que culminam na morte celular das células tumorais. A toxicidade da cisplatina, por exemplo, é decorrente da sua atuação direta na homeostase celular, induzindo apoptose nas células de intensa proliferação por promover adutos de platina no DNA, conforme revisado por Dasari e Tchounwou (2014). Entretanto, em neurônios os quimioterápicos não induzem morte celular. Nos GRDs, os fármacos antitumorais neurotóxicos induzem várias alterações, como na expressão gênica e proteica de canais de cálcio sódio e potássio, na sensibilização de receptores e aumento da liberação de citocinas (LI *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022). Especificamente, a cisplatina induz dano ao DNA nuclear e mitocondrial, aumento da expressão de receptores de potencial transiente e estresse oxidativo (EO - CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

O desenvolvimento de processo inflamatório também está presente na NPIQ, como acima citado (BRANDOLINI *et al.*, 2019). Entender o papel desse grupo de proteínas (citocinas) se torna extremamente importante no contexto da neurotoxicidade periférica dos quimioterápicos, uma vez que podem diretamente estimular e sensibilizar neurônios, como já revisado por Schäfers e Sorkin (2008).

Em ratos da linhagem Sprague-Dawley tratados com paclitaxel (dose cumulativa de 8 mg/Kg) foi observado infiltrado de macrófagos nos GRDs até 21 dias após o tratamento com antitumoral (ZHANG *et al.*, 2016). Os autores também observaram que havia redução da expressão proteica de TNF- α e reversão parcial da hipersensibilidade mecânica induzida pelo paclitaxel após administração de clodronato, uma molécula que depleta macrófagos. corroborando este achado, recentemente observamos que o tratamento com 30 μ M de cisplatina por 24 horas

induz aumento da liberação de TNF- α no mesmo modelo celular apresentado nesse estudo (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

A interleucina 1 β (IL-1 β), por exemplo, é uma citocina inflamatória que é liberada após a morte celular ou estímulo, que está envolvida na regulação da imunidade inata (MENDIOLA *et al.*, 2018). Li e colaboradores (2022) mostraram que o tratamento com oxaliplatina (2 mg/Kg/dia) em ratos da linhagem Sprague-Dawley induzia aumento concentração de IL-1 β no soro desses animais. Em concordância com os dados da literatura, Saadati e colaboradores (2021) observaram o aumento dessa citocina no nervo isquiático de ratos da linhagem Wistar que desenvolveram NP em decorrência do tratamento com oxaliplatina em dose cumulativa de 20 mg/Kg. Esses dados implicam o papel deletério da inflamação na neuropatia induzida pelos quimioterápicos.

1.3. ESTRESSE OXIDATIVO E NPIQ

Sabidamente, um dos mecanismos pelos quais os antitumorais possuem sua atividade antineoplásica é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que induz apoptose celular (BUTTURINI *et al.*, 2013). Pode ser que o mesmo fenômeno ocorra nos neurônios periféricos em decorrência do tratamento antitumoral, e que esse seja um dos fatores que, juntamente com outras alterações celulares, induzem NPIQ.

Helmut Sies cunhou o termo estresse oxidativo no título do seu livro de mesmo nome em 1985, cuja definição ainda usada atualmente é o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes, em favor dos agentes pró-oxidantes, levando a uma perturbação da sinalização e controle redox e/ou dano molecular (SIES, 1985). Isso ocorre devido ao fato de o átomo de oxigênio possuir 6 elétrons na sua camada de valência. Isso significa que ele precisa de mais dois elétrons para estabilizar-se eletronicamente. Dessa forma, usualmente é necessário que ocorra uma ligação a fim de preencher essa camada, geralmente com outro átomo de oxigênio, formando, portanto, a molécula O₂, em que dois elétrons são compartilhados e a camada eletrônica mais externa fica completa. A formação dos

radicais livres de oxigênio ocorre quando essa molécula recebe algum elétron, que induz uma sequência de reações com espécies altamente reativas que culminam na formação de água como mostrado na figura 2.

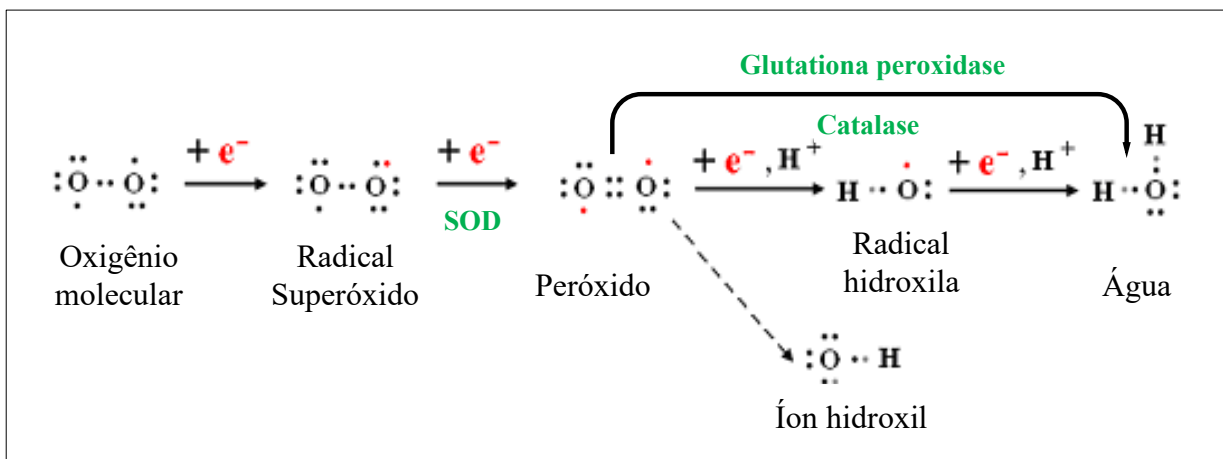


Figura 2. Formação de espécies reativas de oxigênio e as principais enzimas envolvidas nesse processo. Adaptado de CRISTIANA *et al.*, 2012.

Em altas concentrações, as EROs podem ser importantes mediadores de danos celulares, pois são capazes afetar diretamente estruturas celulares, já que interagem com as biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, acarretando a destruição de membranas celulares devido à peroxidação lipídica, alteração na estrutura e função de proteínas ou ainda danos na estrutura do DNA (VALKO *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2015).

Já há algumas evidências da relação do EO com NPIQ. Azevedo e colaboradores (2013) investigaram a relação da NP induzida pela oxaliplatina e o EO. Os autores administraram 1 mg/kg deste antitumoral por via intravenosa em camundongos da linhagem Swiss duas vezes por semana, e observou-se peroxidação lipídica na medula espinhal 14 dias após a primeira administração. Além disso, após 4,5 semanas observou-se também o aumento da nitrosilação de proteínas na medula espinhal em decorrência do tratamento com a oxaliplatina. Essas alterações foram acompanhadas do aumento da hiperalgesia térmica e mecânica induzida pelo citado quimioterápico.

Especificamente com a cisplatina, Jiang e colaboradores (2008) mostraram que em cultura primária de células de GRD de ratos havia aumento de EROs após

tratamento com diferentes concentrações desse antitumoral por 24 horas, observado pela técnica de citometria de fluxo.

Corroborando esses dados, Kelley e colaboradores (2014) mostraram que em cultura primária de células de GRDs, os antitumorais derivados da platina induzem alterações celulares a nível molecular, como por exemplo o aumento do dano ao DNA e alterações funcionais, como na liberação de neuropeptídeos. Além dessas alterações observadas *in vitro*, os autores também observaram perda funcional *in vivo*. Camundongos que receberam tratamento com derivados de platina apresentaram redução da vasodilatação induzida pela capsaicina. Todas essas alterações ocorreram concomitantemente com o aumento de EROs. Esses dados indicam que pode haver relação entre a neurotoxicidade e o EO induzido pelos antitumorais, principalmente devido ao dano ao DNA ser diretamente causado por EO, observado pela mensuração da quantidade de guanina oxidada na posição 8 (8-oxoguanina).

Em revisão publicada em 2018, Waseen e colaboradores compilaram estudos relacionando o papel da mitocôndria e os quimioterápicos na neurotoxicidade periférica e observaram o papel do EO na apoptose, na disfunção bioenergética e no dano mitocondrial que ocorre nos neurônios periféricos após o tratamento antitumoral.

Mais recentemente, Popović e colaboradores (2019), verificaram que em células NTERA-2 cl.D1 (células humanas derivadas de teratocarcinoma da linhagem NTERA-2 cl.D1) diferenciadas em células *neuron-like*, o tratamento com 45 μ M de cisplatina por 60 minutos foi capaz de aumentar a produção de EROs em 8 vezes, quando comparado ao grupo controle, e que a cisplatina também reduziu a extensão de neuritos.

1.3.1 Mecanismo de controle de EROs: via Nrf2/Keap1/ARE

A via *Nuclear factor erythroid 2 related factor 2/Kelch-like ECH associated protein 1/antioxidant response elements* (Nrf2/Keap1/ARE) foi primeiramente relacionada às enzimas de detoxificação de fase II em 1997 por Itoh e colaboradores e atualmente já se sabe que ela é fisiologicamente ativada nas células de acordo com a presença de EROs (TONELLI *et al.*, 2018). Como observado na figura abaixo, em condições basais, a proteína Keap1 se encontra no citoplasma em complexo com o

Nrf2, facilitando dessa maneira a sua ubiquitinação e posterior degradação proteossômica. Em condições em que há exposição às EROs, a afinidade desse complexo é perdida, o que permite uma série de fosforilações do Nrf2 e migração deste para o núcleo, onde se liga à região do DNA denominada de elemento da resposta antioxidante (ARE). Uma vez formado o complexo Nrf2-ARE, dá-se início então à transcrição gênica, em que enzimas com atividades antioxidantes são transcritas, como por exemplo a superóxido dismutase (enzima responsável por dismutar o radical superóxido em oxigênio molecular ou peróxido de hidrogênio) e a catalase (enzima que converte peróxido de hidrogênio em monóxido de hidrogênio e oxigênio molecular (TONELLI *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2013).

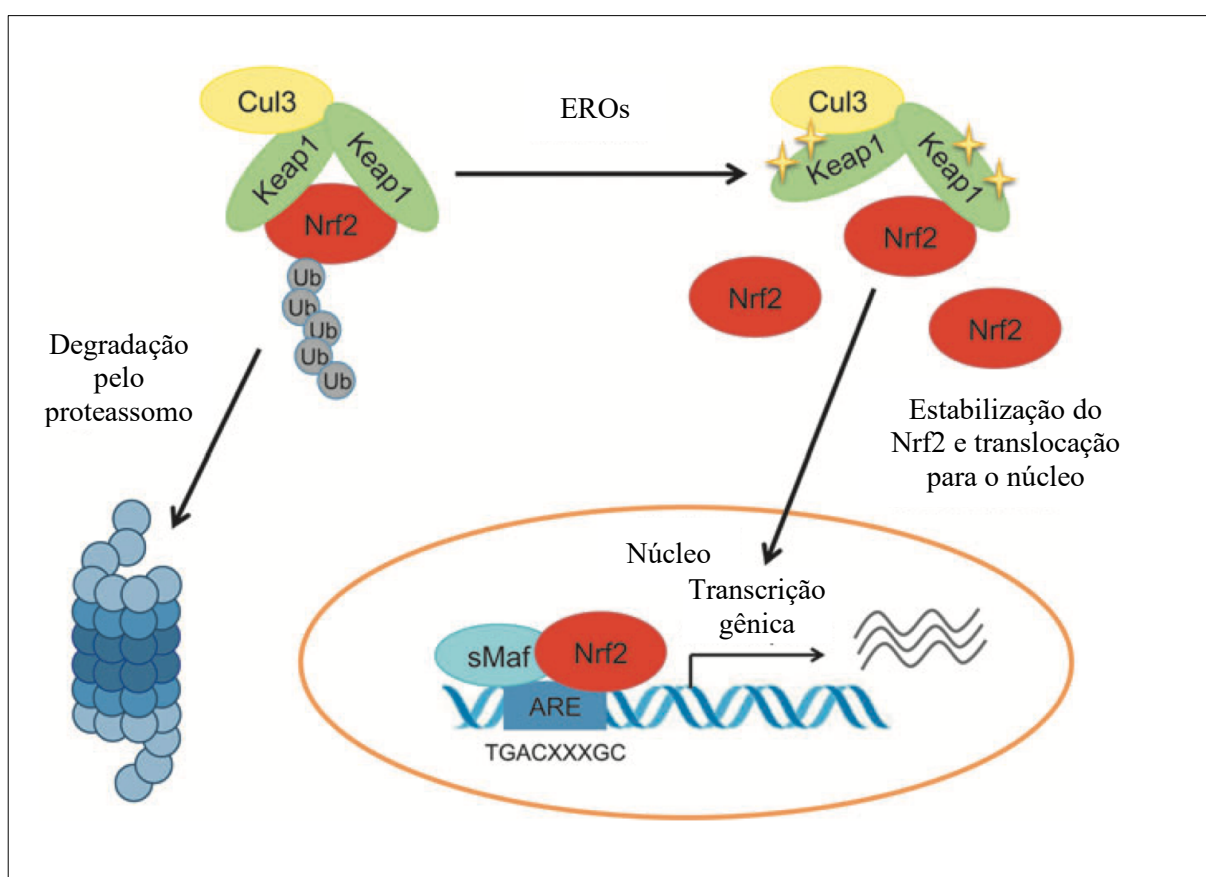


Figura 3. Representação esquemática da ativação da via Nrf2/Keap1/ARE. Na ausência de excesso de EROs, o complexo citosólico Nrf2-Keap1 é constantemente ubiquitinado pela Cul3, e esse é degradado pelo proteossomo. Na presença de EROs, a Keap1 é inativada, o que culmina na liberação e migração do Nrf2 para o núcleo, onde vai promover a transcrição gênica (Adaptado de TONELLI *et al.*, 2018).

O papel da via Nrf2/Keap1/ARE contra o EO está bem estabelecido. Explorar seu papel como alvo terapêutico é promissor. Especificamente no sistema nervoso, diversos estudos mostram a importância da sua ativação em modelos de doenças neurodegenerativas ou não, tais como doença de Alzheimer, Síndrome de Guillain-Barré (CUI *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2016).

Assim, como na NPIQ há alteração na produção de EROs e a ativação da via Nrf2/Keap1/ARE pode reduzir o potencial deletério destas espécies, é plausível que a ativação desta via seja neuroprotetora. Ainda, o EO está presente na NPIQ induzida por diferentes classes de antitumorais, mostrando que embora com mecanismos citotóxicos distintos, esses fármacos induzem alterações celulares comuns, que desencadeiam juntamente com outros fenômenos, a neuropatia. Dessa maneira, investigar essa via na NPIQ é interessante do ponto de vista farmacológico, devido à sua potencialidade terapêutica.

Outro fator que reforça essa ideia foi publicado por Ma e colaboradores (2018), que observaram que embora os estudos não-clínicos com antioxidantes tenham resultados promissores, estudos clínicos mostram que a administração de agentes antioxidantes não foi efetiva no tratamento da NPIQ e atribuem esse fator ao rápido consumo da atividade antioxidante dos antioxidantes. Dessa maneira, uma alternativa seria estimular endogenamente a via de sinalização antioxidante, produzindo neuroproteção.

1.4. NEUROPROTEÇÃO

No contexto da NPIQ, neuroproteção é definida quando a neurotoxicidade é prevenida, diminuída ou mesmo evitada por algum agente externo. Além de neuroprotetor, é igualmente importante que esse agente não afete a atividade antitumoral dos antineoplásicos (PARK *et al.*, 2008).

A neuroproteção pode ser alcançada com diferentes estratégias, como por exemplo com o uso de compostos naturais que reduzem o estresse oxidativo. Azevedo e colaboradores (2013) observaram que os flavonoides (metabólitos polifenólicos oriundos do metabolismo secundário de plantas) rutina e quercetina preveniram o aumento de marcadores de EO na medula espinhal, onde avaliaram a

peroxidação lipídica e nitrosilação de proteínas induzida pela oxaliplatina. Para isso, 1 mg/kg de oxaliplatina foi administrado via intravenosa em camundongos da linhagem Swiss duas vezes por semana, e foi observado que o mencionado quimioterápico induziu peroxidação lipídica na medula espinhal 14 dias após a sua primeira administração. Tal efeito foi prevenido pelo pré-tratamento com 50 mg/kg de rutina ou quercetina, realizado intraperitonealmente 30 minutos antes da administração do derivado de platina. Mediante o mesmo esquema terapêutico, a medula espinhal dos animais foi avaliada após 4,5 semanas e observou-se que havia redução da nitrosilação das proteínas em decorrência do tratamento com quercetina, verificada pela técnica de imunohistoquímica. Essas alterações foram acompanhadas da melhora da hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela oxaliplatina.

Em estudo recente, foi mostrado que a ativação da via Nrf2/Keap1/ARE foi neuroprotetora em modelo de neuropatia periférica induzida por paclitaxel. Os pesquisadores observaram que em ratos da linhagem Sprague-Dawley submetidos ao tratamento com paclitaxel (dose cumulativa 8 mg/kg) havia o desenvolvimento de alodinia mecânica, que era revertida pelo tratamento com oltipraz, um ativador da via Nrf2/Keap1/ARE (ZHOU *et al.*, 2020). Além disso, a ativação desta via mostrou-se neuroprotetora em modelo de neuropatia periférica *in vitro* induzida por derivados da platina e bortezomibe. Em células PC-12 diferenciadas em células *neuron-like* e também em cultura primária de células de GRDs, o dimetil fumarato e seu metabólito, o monometil fumarato (moléculas descritas como ativadoras da via Nrf2/Keap1/ARE), reduziram efeitos neurotóxicos desses quimioterápicos, tais como a inibição do crescimento de neuritos (KAWASHIRI *et al.*, 2018). Efeito alcançado sem que se alterasse a citotoxicidade tumoral desses agentes. Os autores também observaram que nas células PC-12, esses agentes aumentaram a ligação do Nrf2 ao DNA, passo essencial para o desencadeamento da resposta antioxidante.

Ademais, os quimioterápicos que causam NP induzem a liberação de citocinas, e essas por sua vez também sensibilizam nociceptores. Assim, evitar que tal fenômeno ocorra pode ser uma estratégia interessante para alcançar neuroproteção em relação à NPIQ. Uma maneira de mensurar a sensibilização neuronal é através da quantificação da liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Esse é um neuropeptídeo de 37 aminoácidos que está envolvido na nocicepção, na patogênese da dor neuropática e é liberado em uma maior quantidade nos neurônios peptidérgicos após estímulos inflamatórios e/ou despolarizantes tais como citocinas e

KCI (AMARA *et al.*, 1982; HINGTGEN E VASKO, 1994; KELLEY *et al.*, 2014; TOMLINSON *et al.*, 1996; ULLAH *et al.*, 2021; URITS *et al.*, 2020).

No contexto da NPIQ, o envolvimento do CGRP já é conhecido. Em 1996, Barajon e colaboradores observaram aumento de 96% da concentração desse neuropeptídeo nos GRDs após tratamento com cisplatina comparado com animais não tratados (dose cumulativa de 18 mg/Kg). Além disso, é importante ressaltar que os efeitos dos quimioterápicos afetam não somente a funcionalidade neuronal, aqui exemplificada com a liberação do CGRP, como também altera morfológicamente os neurônios que o liberam. Por exemplo, Ko e colaboradores (2014) observaram que o tratamento com paclitaxel em diferentes doses (dose cumulativa de 2,0, 4,0 ou 8,0 mg/Kg) reduzia a inervação dos neurônios imunorreativos para CGRP da pele de ratos da linhagem Sprague-Dawley. Esse efeito foi observado após 7 dias de tratamento e persistiu até 28 dias depois da finalização do tratamento. Assim, alterações na síntese ou função de neurônios que contenham esse peptídeo podem interferir na NPIQ e o evitar ou reverter estas alterações pode ser uma alternativa importante no complexo tratamento da NPIQ.

1.5 *Eugenia dysenterica* DC: POTENCIAL EFEITO NEUROPROTETOR

Segundo o Ministério do Meio Ambiente, o Brasil possui a maior parcela da biodiversidade mundial, entre 15-20% do total (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, s.d.). Nesse contexto o Cerrado apresenta características importantes, considerado um dos *hotspots* da biodiversidade global, que são áreas ameaçadas e que possuem uma alta concentração de espécies excepcionalmente endêmicas (MYERS, 2000; STRASSBURG *et al.*, 2017). Esse é o segundo maior bioma da América do Sul (2.036.448 km²), e engloba estados de todas as regiões brasileiras e o Distrito Federal: Norte (Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima e Tocantins), Nordeste (Bahia, Maranhão e Piauí), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Sul (Paraná) e Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, s.d.).

Devido às suas características geográficas, como o potencial aquífero e extensão territorial, há um favorecimento do desenvolvimento da sua biodiversidade.

Essa por sua vez é representada por uma grande quantidade de animais vertebrados e invertebrados e diversas espécies de plantas, que inclui 11.627 espécies catalogadas, as quais mais de 4.800 espécies de plantas e vertebrados são endêmicas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, s.d.; STRASSBURG *et al.*, 2017). Dessa forma, explorar o potencial farmacológico desse rico bioma pode ser uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Nesse contexto, destacamos a *Eugenia dysenterica* DC (popularmente conhecida como Cagaita ou Cagaiteira – figura 4 – A e B), que é uma árvore da família Myrtaceae encontrada no Cerrado de diversos estados do Brasil, são eles: Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Maranhão, Pará, Piauí, São Paulo e Tocantins (SILVA *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2013). Essa planta produz um fruto, também chamado de cagaita (figura 4 – C e D), que é comestível e possui um importante valor econômico (RODRIGUES *et al.*, 2016; MARTINOTTO *et al.*, 2008). Isso se deve à polpa desses frutos, que é utilizada para produção de diversos produtos tais como licores, sorvete e suco (CARDOSO *et al.*, 2011). Além do consumo *in natura* da polpa das frutas, essa planta também possui valor terapêutico. Na medicina popular brasileira, seus frutos são consumidos em casos de constipação, já que eles possuem efeito laxativo (LIMA *et al.*, 2010).

Além disso, diversas outras atividades farmacológicas já foram descritas, tais como do óleo essencial com atividade antifúngica (COSTA *et al.*, 2000) e antidiarreica (LIMA, *et al.*, 2010; GALHEIGO, *et al.*, 2016), atividade hipotensora do extrato aquoso das folhas (FIDELIS-DE-OLIVEIRA, *et al.*, 2020). Também, o extrato da *E. dysenterica* possui atividade antioxidante *in vitro* (CLEMENTINO *et al.*, 2016). Desta forma, é possível que além atuar diretamente nas EROs (induzindo a síntese de enzimas com atividade antioxidantes, por exemplo), estes extratos possam ativar a via de sinalização antioxidante. Cabe ressaltar que produtos naturais com alto teor de flavonoides são facilmente encontrados em espécies de plantas nativas de biomas brasileiros, podendo assim, ser uma fonte de agentes antioxidantes e, portanto, neuroprotetores (CARVALHO *et al.*, 2017).

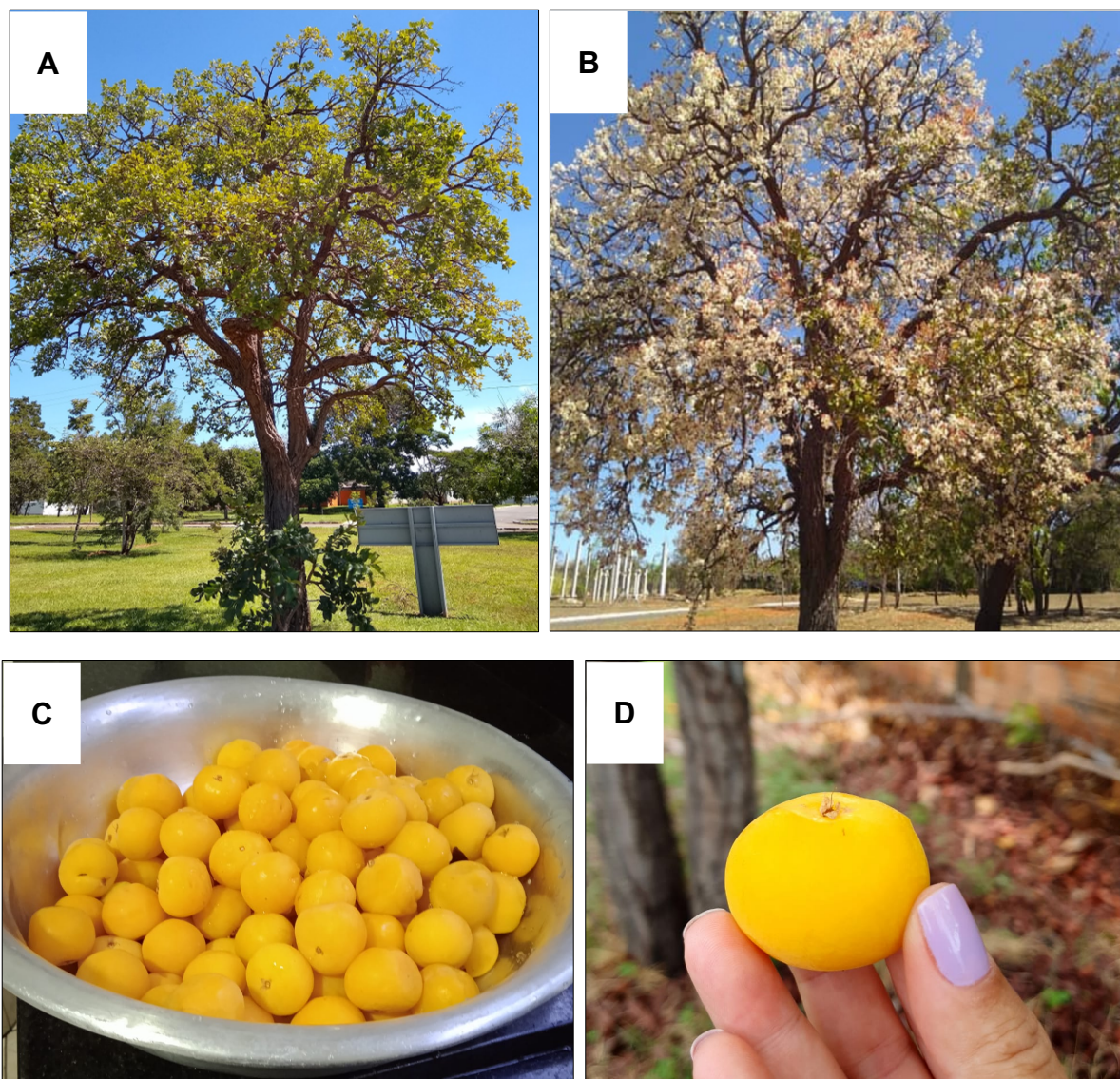


Figura 4. *E. dysenterica* e seus frutos. **A.** fotografia da *E. dysenterica* no período do outono. **B.** Fotografia da *E. dysenterica* em seu período de floração na primavera. **C.** Fotografia dos frutos maduros da Cagaita, também conhecidos como cagaita. Os frutos possuem coloração amarela com pele delicada e sabor levemente adocicado **D.** Cagaita madura em maior detalhe. Todas as fotografias são de autoria própria.

Ademais, em estudo colaborativo realizado com o Laboratório de Farmacologia Experimental da UnB foi observado que esse mesmo extrato possui ações anti-inflamatórias e anti-nociceptivas nos modelos de formalina e carragenina em ratos da linhagem Wistar (resultados ainda não publicados).

Baseado nessas premissas, esse trabalho possui a hipótese de que a neuroproteção contra a neurotoxicidade da cisplatina é alcançada pelo tratamento com extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial efeito neuroprotetor do extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* em modelo *in vitro* de neuropatia periférica induzida por cisplatina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* altera a viabilidade celular da cultura primária de células de GRDs;
- Investigar se o extrato de *E. dysenterica* interfere na toxicidade tumoral da cisplatina;
- Realizar curva concentração-efeito de cisplatina e do extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica* na liberação de CGRP em cultura primária de células de GRDs;
- Investigar se o extrato de *E. dysenterica* modula a liberação de CGRP em cultura primária de células de GRDs tratada com cisplatina;
- Realizar curva concentração-efeito de cisplatina e do extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica* na liberação de IL-1 β em cultura primária de células de GRDs;
- Realizar curva concentração-efeito de cisplatina e do extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica* na liberação de EROs em cultura primária de células de GRDs e de células PC-12;
- Investigar se o extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica* modula a liberação de EROs em cultura de células PC-12 tratada com cisplatina;
- Investigar o efeito da cisplatina e do extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* na expressão gênica de SOD-2 e NRF2 em cultura primária de células de GRDs;

- Investigar se o extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* modula a via Nrf2/Keap1/ARE em cultura primária de células de GRDs tratada com cisplatina;
- Investigar o efeito da cisplatina e do extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica* na neuritogênese em células PC-12;
- Investigar se o extrato de *E. dysenterica* modula a neuritogênese alterada pela cisplatina em cultura de células de PC-12.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

As culturas primárias de células de GRDs e os subsequentes experimentos, foram feitos no Brasil e nos Estados Unidos da América (EUA). No Brasil os experimentos foram realizados com ratos *naïves* da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar e nos EUA com a linhagem Sprague-Dawley, todos com peso compreendido entre 150-250 g. Os animais foram alocados em grupos de 2 - 4 animais por gaiola nos biotérios da *Indiana University School of Medicine* e da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade de Brasília (UnB), com temperatura ambiente controlada com média de 24°C e umidade ambiente. As gaiolas foram forradas com materiais absorventes como maravalha ou espiga de milho triturada, que foram trocadas a cada 2 dias. Não houve restrição alimentícia ou hídrica para os animais, e esses estavam submetidos ao ciclo-escuro, dividido em 12 horas em ambiente claro e 12 horas no escuro. Todas as manipulações realizadas com os animais foram feitas no intervalo entre 8 e 16 horas.

3.2. REAGENTES

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram obtidos da empresa Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, US). Seus números de catálogo foram discriminados imediatamente após a sua descrição. Aqueles obtidos de outras empresas, foram identificados com o nome da companhia e seu respectivo número de catálogo.

O extrato utilizado nesse trabalho foi gentilmente fornecido pela Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista, professora do Departamento de Farmácia da UnB.

3.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *E. dysenterica* DC

Para a obtenção do extrato de *E. dysenterica*, foram coletadas folhas da planta disponíveis no campus Darcy Ribeiro da UnB em junho de 2014, Brasília, Distrito Federal. A planta foi identificada pelo Dr. Christopher Fagg e o material testemunho da espécie (UB 914) depositado no herbário da UnB, Brasília, DF (GASCA *et. al.*, 2017). As folhas foram lavadas, secas em estufa a 40°C, pulverizadas e em seguida, o pó resultante foi separado em tamis com nº 0,01 *mesh*. A 100 g do material botânico resultante, foi adicionado 500 mL de água destilada a aproximadamente 70°C para realizar a infusão. A suspensão foi submetida à filtração após resfriar para a temperatura de 40°C, e em seguida foi mantida a -30°C onde foi possível realizar o processo de liofilização. O extrato bruto obtido após esse último processo foi mantido a -20°C até sua utilização nos ensaios biológicos (GASCA *et. al.*, 2017). Para as próximas sessões, o extrato será referido como extrato de *E. dysenterica*. Todas as soluções de trabalho foram feitas com extrato diluído em DMSO, sendo, portanto, esse último usado como controle negativo na concentração de 0,1%. Todas as alíquotas do extrato utilizadas nesse trabalho provêm de um mesmo lote. O acesso à citada espécie vegetal foi concedido pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen, A215A9A).

3.4. CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DOS GÂGLIOS DA RAÍZES DORSAIS

As culturas primárias de células de gânglio da raiz dorsal (GRD) foram realizadas de modo asséptico, onde os GRDs foram removidos de todos os níveis da coluna vertebral bilateralmente e suas células foram cultivadas de acordo com método previamente descrito por Burkey *et al* (2004). Os animais foram anestesiados com isoflurano (Isoforine® - Laboratórios Cristália, São Paulo, Brasil) e a eutanásia foi realizada com dióxido de carbono - CO₂. Uma vez verificada visual e manualmente a ausência de sinais vitais (parada cardiorrespiratória), os animais foram decapitados com o auxílio de uma guilhotina, exanguinados e as colunas vertebrais foram expostas

e removidas. Músculos e excesso de ossos foram removidos, com o objetivo de permitir a próxima etapa, a secção sagital da coluna. Com essa dividida, a medula espinhal foi removida, os GRDs expostos e, com auxílio de pinças e de estereoscópio com fonte luminosa, foram removidos de seus respectivos forames e colocados em solução de PUCK's-salina (livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}) adicionado de 250 $\mu\text{g/mL}$ fungizona (Gibco – Cat. n. 15290-018) a 4°C. As raízes centrais e periféricas dos GRDs foram removidas com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, objetivando reduzir ao máximo possíveis debris na cultura celular. Todos os processos foram realizados sob placa de gelo artificial (4 °C) Em seguida os GRDs foram incubados em collagenase (Cat. n. C9891) na concentração de 0,125% diluída em meio de cultura F12 (Gibco – Cat. n. 21765037) acrescido de 14 M de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) com pH de 7,2 a 37°C, com atmosfera de 3% de CO_2 em incubadora por 1,5 hora, perfazendo assim, o processamento enzimático dos gânglios.

Imediatamente após esse procedimento, a collagenase foi removida e então foi adicionado 3 mL de meio F12 (Gibco) suplementado com 10% de soro de cavalo inativado por calor (Gibco – Cat. n. 16050114), 2 mM de L-glutamina (Gibco – Cat. n. 25030081), penicilina e estreptomicina (5000 Unidades/mL e 5 mg/mL, respectivamente. Gibco – Cat. n. 15070-063), 30 ng/mL de fator de crescimento do nervo (NGF – Cat. n. N0513) e 100 $\mu\text{g/mL}$ de normocina (Invivogen – Cat. ant-nr-2). Os GRDs então sofreram sucessivas ressuspensões (20 vezes) com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro acoplada a uma pêra, objetivando a completa dissociação dessas estruturas.

Em seguida, as células já dissociadas foram distribuídas em placas de 24 poços pré-tratadas com Poli-d-lisina na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Cat. n. P0899) e 1 mg/mL de laminina (Cat. n. L2020) com aproximadamente 30.000 células/mL. O meio de cultura foi trocado 48 horas após o plaqueamento e posteriormente a cada dois dias até a realização dos experimentos.

3.5. CULTURA DE CÉLULAS A549

Para avaliar se o extrato de *E. dysenterica* interfere no efeito antitumoral da cisplatina, foram utilizadas células A549 (*American Type Culture Collection* - ATCC® CCL-185™), gentilmente doadas pelo Dr. Felipe Saldanha de Araújo, professor do Departamento de Farmácia da FS-UnB. As células foram mantidas em garrafas de 75 a 150 cm² a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 acrescido de, 2 g/L de bicarbonato de sódio, 50000 UI/L de penicilina, 0,86 mM de estreptomicina, 10% de soro fetal bovino. A cada 2 ou 3 dias o meio de cultura foi trocado e as células foram cultivadas por 3 ou 4 dias. Após esse período, as células foram desaderidas com tripsina 0,5% (Cat. n. T4799 – 37°) e semeadas em placas de 24 ou 96 poços para os ensaios subsequentes de viabilidade celular.

3.6. CULTURA DE CÉLULAS PC-12

Para os ensaios de quantificação de neuritos e de estresse oxidativo, foram utilizadas células PC-12 (*American Type Culture Collection* - ATCC® CRL -1721™). As células 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. Até o ensaio, as células foram mantidas em garrafas de 75 a 150 cm² a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ em meio 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 estreptomicina, 10% de soro de cavalo inativado por calor e 5% de soro fetal bovino. A esse meio, a denominação 'meio RPMI completo' foi utilizada. A cada 2 ou 3 dias o meio de cultura foi trocado 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 24 poços.

3.7. VIABILIDADE CELULAR PELA EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPANO

Para verificar a toxicidade dos extratos na viabilidade celular, foi realizado o método de exclusão pelo corante azul de tripano. Uma característica desse corante é a ausência da capacidade de atravessar membranas celulares íntegras. Dessa forma, células com a membrana celular sem dano, isto é, vivas, permanecem incolor ao serem visualizadas no microscópio, porém, aquelas cuja membrana foi danificada, serão permeáveis ao corante e terão uma tonalidade azul (STROBER, 2001). Para assegurar a totalidade de células a serem quantificadas para verificação da viabilidade, todas as soluções foram reservadas em um tubo cônico para avaliação. Primeiramente, o meio de cultura foi coletado, em seguida 500 μ L de PBS 1X (37°C) foi utilizado para lavar os poços e também reservado. Após esse procedimento, foi adicionado 200 μ L de tripsina 0,5% (37°C), e a placa foi incubada a 37°C em incubadora por 2 minutos. A suspensão foi coletada e os poços foram novamente lavados com 500 μ L de PBS 1X. Essa última solução foi adicionada às demais, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. Dessa solução, foi coletado 10 μ L, que foram diluídos com 10 μ L de solução de azul de tripano 0,4%. As amostras foram então incubadas por 5 minutos e em microscópio óptico, com o auxílio de um hemocítmetro, as células foram contadas por um experimentador cego quanto às variáveis do tratamento. As células presentes nos 4 quadrantes maiores das extremidades foram contadas e o valor obtido foi dividido por 4, a fim de obter-se a média amostra. Ao resultado, foram realizados cálculos considerando os fatores de diluição e o volume do hemocítmetro. Para determinação da concentração tóxica, foram realizadas curvas concentração-resposta com pelo menos 3 pontos.

3.8. ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE CGRP

Para avaliar a possível atividade neuroprotetora dos tratamentos contra os efeitos neurotóxicos da cisplatina, foi verificada a funcionalidade dos neurônios por

intermédio da liberação de neuropeptídeos. Esse experimento consiste na quantificação do CGRP liberado nas culturas em diferentes condições através do Radioimunoensaio (RIA), como previamente descrito por Park e colaboradores (2014) e Pittman e colaboradores (2014), com pequenas modificações como apresentado a seguir.

O RIA é uma técnica sensível que permite mensurar quantidades muito pequenas de determinado antígeno em uma amostra, nesse caso, uma proteína. Nesse estudo, é possível quantificação em fentomolar.

3.8.1. Coleta das amostras

O experimento de liberação de CGRP foi dividido em 4 etapas no dia 7 em cultura:

- Etapa 1: Lavagem e coleta das amostras de liberação basal de CGRP 1;
- Etapa 2: Coleta das amostras de liberação de CGRP após estímulo por 10 minutos com capsaicina 30 nM ou KCL;
- Etapa 3: Coleta das amostras de liberação basal de CGRP 2;
- Etapa 4: Coleta das amostras do conteúdo total de CGRP.

Na 1ª etapa, o meio de cultura, juntamente com os tratamentos foram aspirados e então, os poços foram lavados com 0,4 mL de tampão HEPES (25 mM de HEPES, 135 mM de NaCl, 3,5 mM KCl, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 3,3 mM de D-glicose e 0,1 % de albumina bovina sérica [Cat. n. 05470], pH 7,4). Imediatamente após a lavagem, a cultura foi incubada a 37°C por 10 minutos com 0,4 mL desse tampão. O sobrenadante de cada poço foi coletado individualmente e mantido em temperatura ambiente até a próxima etapa.

A segunda etapa consistiu em incubação da cultura a 37°C com 0,4 mL de tampão HEPES, acrescido de 30 nM de capsaicina ou 50 mM de KCl por 10 minutos. A capsaicina induz a liberação de CGRP em um subtipo específico de neurônios, uma vez que essa resposta é desencadeada apenas em neurônios positivos para os Receptores de Potencial Transitório Vanilóide do tipo 1 (TRPV1) – alvo farmacológico

da capsaicina, em que há a abertura de canais de Ca^{2+} , o que culmina em uma liberação maior de CGRP. Diferentemente da capsaicina, o KCl induz uma resposta pan-neuronal, onde há despolarização de todos os neurônios peptidérgicos. O sobrenadante de cada poço foi coletado individualmente, diluído 2 vezes e mantido em temperatura ambiente até a próxima etapa.

Na terceira etapa, as culturas foram incubadas a 37°C com 0,4 mL de HEPES, sem qualquer estímulo por 10 minutos. Esse passo foi necessário para que a liberação basal de CGRP fosse reestabelecida, além de ser necessária para verificar se o estímulo anterior não foi tóxico para as células, o que poderia aumentar a liberação do neuropeptídeo. O sobrenadante de cada poço foi coletado individualmente e mantido em temperatura ambiente até a próxima etapa.

A última etapa consistiu na incubação das culturas a 37 °C com 0,3 mL de ácido clorídrico (HCl) a 0,05 N por 10 minutos. Devido à lise celular hipotônica promovida pelo HCl, todo o CGRP remanescente na cultura é liberado no sobrenadante. Esse por sua vez, foi coletado, diluído 40 vezes e mantido em temperatura ambiente.

3.8.2. Radioimunoensaio

Os sobrenadantes foram submetidos ao radioimunoensaio para determinação da quantidade de CGRP. Assim, foi adicionado à cada amostra 25 μL do anticorpo anti-CGRP em uma concentração de 1:5000 (gentilmente cedido pelo Dr. Michael J Iadarola) e 25 μL de $\text{I}^{125}\text{CGRP}$, cuja concentração foi de 3000 contagens por minuto (cpm) e mantidas *overnight* a 4°C.

Juntamente às amostras, foi confeccionada uma curva-padrão com concentrações conhecidas de CGRP para comparação com os resultados das amostras. Dessa maneira, foram feitos 14 pontos em duplicata com quantidades crescentes de CGRP (diluídos em tampão HEPES), cujo volume final foi de 0,4 mL, sendo eles: Total (somente esse ponto da duplicata recebeu apenas 25 μL de $\text{I}^{125}\text{CGRP}$, sem anticorpo), Branco; 0,0 fM; 1,0 fM; 2,5 fM; 5,0 fM, 7,5 fM, 10,0 fM, 25,0 fM, 35,0 fM, 50,0 fM, 75,0 fM, 100,0 fM e 250,0 fM. Como as amostras, à curva-padrão

também foi adicionado 25 μL do anticorpo anti-CGRP em uma concentração de 1:5000 e 25 μL de $\text{I}^{125}\text{CGRP}$, cuja concentração foi de 3000 cpm. A curva foi igualmente incubada *overnight* a 4°C.

3.8.3. Adsorção com carvão ativado e análise

Usou-se o carvão ativado com o propósito de isolar o complexo $\text{I}^{125}\text{CGRP}$ -anticorpo anti-CGRP do $\text{I}^{125}\text{CGRP}$ livre, presente nas amostras. Assim, o carvão ativado adsorve o $\text{I}^{125}\text{CGRP}$ livre, que então é passível de separação da amostra a ser analisada. Para isso, adicionou-se à cada amostra e à curva-padrão (excetuando a duplicata 'Total') 500 μL da suspensão de carvão ativado a 4°C (0,1 M de NaH_2PO_4 , 51,3 mM de NaCl, 0,1% de BSA e 1% de carvão ativado – Cat. n. C4386, pH 7,4). Essas suspensões foram centrifugadas a 3000 rpm por 25 minutos a 4°C, com o auxílio de uma centrífuga refrigerada (Beckmann TJ6 Centrifuge, Califórnia, USA). Os sobrenadantes foram então transferidos para tubos de ensaio novos e então as amostras foram lidas em contador gama (Perkin Elmer – 2470 Wizard 2, Massachusetts, USA).

A mensuração do $\text{I}^{125}\text{CGRP}$ foi realizada após comparação com os resultados obtidos da curva-padrão, e foram representados como % do conteúdo de $\text{I}^{125}\text{CGRP}$ /10 minutos.

3.9. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY – ELISA

Para avaliar o efeito do extrato de *E. dysenterica* sobre a liberação de IL-1 β nas culturas primárias de células de GRDs, realizamos o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Para isso, utilizamos o kit Rat IL-1 β DuoSet ELISA (R&D systems – Cat n. DY501-05). As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços de poliestireno com volume total de 0,36 mL, sendo que cada placa continha 12 *strips* de 8 poços (Costar, Cat. n.

2592) que foram adsorvidos com anticorpos de captura para IL-1 β em temperatura ambiente *overnight*. Para evitar ligações inespecíficas, os poços foram então bloqueados com 300 μ L de PBS 1X acrescidos com 1% de BSA por 1 hora em temperatura ambiente e logo em seguida, com a placa seca, 100 μ L de amostra foram adicionados em cada poço, para permitir a ligação entre a IL-1 β liberada pelas células da cultura primária de GRDs no meio de cultura e o anticorpo. Após essa ligação, os poços foram lavados e incubados por 2 horas em temperatura ambiente com 100 μ L do anticorpo de detecção (anticorpo secundário específico para IL-1 β), que é conjugado à enzima Streptavidin-HRP B. Essa por sua vez, converte seu substrato (1:1 de uma mistura do Reagente A, H₂O₂, e o Reagente B, Tetramethylbenzidine) em um composto colorido, que pode ter sua densidade óptica mensurada em espectrofotômetro de placas. Para essa etapa, foram adicionados 100 μ L do supracitado substrato, que ficou ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A leitura da absorbância das amostras foi então realizada com o leitor de placas HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Synergy, Vermont, USA) no comprimento de onda de 450 e 540 nm após 20 minutos de incubação. Juntamente às amostras, foi confeccionada uma curva-padrão com concentrações conhecidas de IL-1 β para comparação com os resultados das amostras. Dessa maneira, de acordo com o manual de instruções do fabricante, foram feitos 9 pontos em duplicata com quantidades crescentes dessa citocina, são eles: Branco; 0,0 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 2000 pg/mL e 4000 pg/mL (diluídos em PBS 1X acrescido de 1% albumina bovina sérica [BSA, do inglês *bovine serum albumin*], pH 7,2). Essa curva-padrão foi utilizada para o cálculo das concentrações desconhecidas das amostras.

A amostra utilizada foi o sobrenadante do meio de cultura e utilizou-se como controle negativo dos experimentos uma reação contendo água em substituição da amostra e com os demais componentes da reação. O comprimento de onda foi corrigido subtraindo-se a leitura realizada em 450 nm pela realizada em 540 nm, etapa é necessária para excluir imperfeições oriundas da placa de leitura.

3.10. EXPRESSÃO GÊNICA

Para analisar a expressão do RNAm de genes relacionados ao estresse oxidativo, utilizou-se a técnica da transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-PCRq). O gene da β -actina foi utilizado como controle endógeno.

Assim, o RNAm total das culturas de GRDs foi extraído com o reagente TRI Reagent® de acordo com instruções do fabricante. Primeiramente, cada poço das culturas foi lavado 1 vez com tampão fosfato salina 1X (*phosphate buffered saline* - PBS) a 37°C, e posteriormente 1 mL de TRI Reagent® foi adicionado a cada amostra (1 mL de reagente para cada tratamento) sob banho de gelo 5 minutos, com o objetivo de extrair a totalidade do material gênico e padronizar o tempo de extração nas células em cultura. Decorrido os 5 minutos, realizou-se movimentos de '*up and down*' para completa lise celular e como consequência, a liberação do material gênico. Uma vez que as células foram lisadas, para eliminação de possíveis debris presentes na amostra, foi realizado a homogeneização em vórtex e centrifugação a 14.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo.

Com a amostra livre de debris, para isolar a fase aquosa do reagente que conterá o RNA total (RNAt), à amostra foi adicionado 200 μ L de clorofórmio, onde procedeu-se a homogeneização e centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em decorrência desses processos, a amostra acrescida de clorofórmio foi separada em 3 fases: a fase orgânica (fase inferior onde estão contidas as proteínas); a fase intermediária (contém o DNA); e por fim, a fase de interesse, a aquosa (fase incolor superior que contém RNAt). Essa última foi isolada, foram adicionados 500 μ L de isopropanol, para que, após a homogeneização em vórtex seguida de incubação da amostra a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto a 4°C, o RNAt fosse precipitado, obtendo-se assim um *pellet*. Nesse foi adicionado 1 mL de etanol na concentração de 75% para lavagem do RNAt. Para isto, o pellet, imerso no etanol 75%, foi homogeneizado e novamente centrifugado (9.000 rpm por 5 minutos a 4°C). Após essa última centrifugação, o etanol foi descartado e o pellet resultante foi seco e diluído em 15 μ L de água livre de ribonuclease (RNase).

Posteriormente, a concentração de RNAm foi determinada por intermédio de espectrofotometria (NanoVue Plus – GE Health, Life Sciences, Buckinghamshire, UK). Essa análise também permite avaliar a pureza das amostras, pois apenas aquelas consideradas puras (livre de DNA e proteínas) foram utilizadas nesse estudo. Para tanto, amostras puras foram aquelas cuja razão da absorbância do comprimento de onda de 260 nm pelo comprimento de onda de 280 nm foi $\geq 1,7$.

Para assegurar que as amostras estivessem livres de DNA, o que poderia ser um eventual interferente nas análises subsequentes da RT-PCRq, foi realizado o tratamento com a enzima desoxirribonuclease I (DNase 1), uma endonuclease extraída de pâncreas bovino. Esse tratamento foi realizado utilizando-se o kit DNase – AMPD1, conforme recomendações do fabricante. Das amostras foi tratado 1 µg de RNAt com 1 unidade/µL de DNase 1 em um volume final de 10 µL a temperatura ambiente por 15 minutos. Decorrido esse tempo, acrescentou-se à amostra 1 µL de tampão de inativação (*Stop solution*), que continha ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - 50 mM, pH 8,0), necessário para inativação da enzima, uma vez que realiza quelatação do cálcio e o magnésio, cofatores da enzima. Após a inativação química da DNase, foi realizada a inativação física da enzima, onde as amostras foram mantidas em termociclador a 70°C por 10 minutos (Bio-rad, Hercules, EUA), para desnaturar a enzima.

As amostras de RNA foram armazenadas em freezer a -80°C até sua utilização na RT-PCRq em tempo real.

3.10.1. Obtenção dos *primers*

As sequências de ácidos nucleicos utilizadas como iniciadoras para os genes da β -actina, SOD-2 e NRF2, aqui denominadas *primers*, foram obtidas da literatura. Como critério para a escolha dos primers foram obedecidas as seguintes condições: porcentagem de guanosina e citosina (GC), tamanho do *amplicon* (produto amplificado), tamanho do *primer*, temperatura de anelamento *in silico*. Assim, os *primers* deveriam conter entre 30% e 60% de GC, gerar um *amplicon* de até 200 pares de base (pb), possuir de 18 a 23 pb e a temperatura de anelamento em torno de 60°C.

Para verificar a especificidade dos primers e o tamanho do *amplicon* esperado, a ferramenta BLAST do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foi utilizada.

As sequências de *primers* foram adquiridas da empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT, Coralville, US), são elas: SOD-2 *forward*: 5' GCC TGC ACT GAA GTT CAA TGG 3', SOD-2 *reverse*: 5' CCC AAA GTC ACG CTT GAT AGC 3' (*amplicon*: 124 pb - HUANG *et al.*, 2014); NRF2 *forward*: 5' GAC CTA AAG CAC AGC CAA CAC AT 3', NRF2 *reverse*: 5' CTC AAT CGG CTT GAA TGT TTG TC 3' (*amplicon*: 181 pb - CHEN *et al.*, 2016) e β -actina *forward*: 5' AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT 3', *reverse*: 5' GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG 3' (*amplicon*: 150 pb - LI *et al.*, 2016).

3.10.2. Validação dos primers

Para determinar as melhores condições necessárias para a amplificação dos genes de interesse, os *primers* de SOD-2 e NRF2 foram previamente validados. Esse procedimento permite verificar a eficiência de amplificação. O primer que amplifica o gene da β -actina foi validado em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa.

Para esse estudo, *primers* que possuíram eficiência entre 90 e 110% ($100\% \pm 10$), com valor de inclinação da curva-padrão próximo a -3,32 ($-3,32 \pm 0,2$) e com coeficiente de determinação (r^2) maiores do que 0,95 foram considerados aptos para o uso. Assim, foi confeccionada uma curva de diluição seriada com 5 pontos e fator de diluição de 5 (curva-padrão), cuja concentração inicial foi de 20 ng de RNAt seguido dos pontos 4,0 ng, 0,8 ng, 0,16 ng e 0,032 ng de RNAt. Todos os pontos foram diluídos em 4,5 μ L de água livre de RNase. As validações dos primers foram realizadas com a concentração de 10 μ M de cada par de primer.

As reações da curva -padrão foram realizadas em triplicata, e a mensuração dos valores foi realizada no equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems modelo AB7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os dados obtidos foram analisados no programa Software StepOne versão 2.1.

Além desses dados, a especificidade e a ausência da formação de dímeros de cada par de *primer* foram avaliadas. Para isso, uma curva de dissociação, chamada de curva de *melting*, foi confeccionada. As amostras foram aquecidas a 60°C e submetidas a aumentos graduais de temperatura (acréscimos de 0,3°C) até 95°C. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência da reação decresce. O ponto correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação (*melting temperature* - T_m) e determina o momento em que o *amplicon* apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A T_m é específica para cada sequência de DNA amplificada, assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de primers utilizado. Os dados obtidos foram analisados em um gráfico da razão entre a derivada da fluorescência e a derivada da temperatura (dF/dT) em relação a temperatura, obtido pelo próprio programa.

3.10.3. Análise da expressão Gênica por RT-PCRq

A transcrição reversa (RT) e a amplificação por PCR quantitativa (PCRq) foram realizadas em um único passo utilizando-se o kit Power SYBR® Green RNA-to-CT 1- Step (Applied Biosystems, Foster City, EUA), conforme instruções do fabricante. Nesse método, a amplificação do gene de interesse é mensurada pela quantidade de luz emitida pelo corante SYBR® Green I, fluoróforo com capacidade de intercalar-se a fitas duplas de DNA, e emitir fluorescência. Uma vez que há aumento do produto formado, há maior intercalação do corante, e consequentemente maior quantidade de luz emitida. O sinal luminoso é lido e traduzido em forma numérica, representado pelo *cycle threshold* (C_t – Ciclo limiar, em tradução livre), que corresponde ao número de ciclos necessários para que a amplificação se torne exponencial.

As reações de amplificação foram realizadas em placas MicroAmp® de 96 poços, livres de DNA, RNA e RNase, com volume de 0,1 mL. Para isso, cada reação possuía volume final de 10 μ L e nesses continha 0,08 μ L de Mix da enzima RT (125x), 5 μ L de Mix Power SYBR® Green RT-PCR (2X), 0,2 μ L (200 nM) de cada primer (concentração inicial de 10 μ M) e 10 ng de RNA. O volume foi completado com água

livre de RNase, como pode ser observado no quadro abaixo (quadro 1). Utilizou-se como controle negativo dos experimentos uma reação contendo água em substituição da amostra.

Quadro 1 – Reagentes utilizados por reação nos experimentos de RT-PCRq

Reagente	Volume
Mix Power SYBR® Green RT-PCR (2×)	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 (125×)	0,08 µL
RNAm (10 ng)	4,50 µL
Água livre de RNase	0,02 µL
Volume Final	10,00 µL

Todos os ensaios gênicos foram realizados no equipamento StepOnePlus modelo AB7500 e os dados obtidos foram obtidos pelo programa Software StepOne versão 2.1. Os valores de Ct obtidos dos genes de interesse foram normalizados em função da expressão de β -actina, o controle endógeno das amostras. Para isso, os Ct dos genes alvos foram subtraídos do Ct da β -actina, o Δ Ct. A expressão relativa dos genes foi realizada utilizando o método de comparação do Ct ou $\Delta\Delta$ Ct. Assim, a expressão relativa do gene corresponderá ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostras} - \Delta Ct \text{ calibrador}$, sendo o calibrador a amostra tratada com veículo (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001).

3.11. QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO - EROs

Para verificar a presença e quantificar as EROs após os tratamentos com cisplatina e extrato de *E. dysenterica*, utilizamos duas técnicas de mensuração: 1- ressonância eletrônica paramagnética (do inglês, *electron paramagnetic resonance* – EPR); 2- fluorimetria.

3.11.1. Mensuração de EROs por EPR

Essa é uma técnica baseada na absorção de radiação eletromagnética, por uma amostra paramagnética, isto é, aquela que possui capacidade de alinhar seus elétrons após a submissão de um campo magnético. Essas absorções acontecem apenas em combinações de frequências e campo magnético muito bem definidas, que dependem da espécie paramagnética e suas características (HAWKINS E DAVIES, 2014). Uma vez que essa técnica espectroscópica permite verificar de maneira muito sensível a inversão de *spin* de elétrons desemparelhados, EROs são passíveis de serem quantificados. Embora detectáveis, a inversão de *spin* de moléculas como o ânion superóxido é bastante rápida e mecanismos celulares de controle do estresse oxidativo se mostram uma barreira no uso da técnica. Dessa forma, é necessário recorrer a marcadores de *spin* (*spin probe*) para essa detecção de EROs em sistemas biológicos, como o 1-hidroxi-3-metoxycarbonil-2,2,5,5- tetrametilpirrolidina (CMH), utilizado nesse estudo.

As demais soluções utilizadas nesse estudo foram preparadas imediatamente antes dos experimentos, em tampão Krebs-HEPES (Cat. KHB - NOX-7,6, Noxygen, Elzach, Alemanha), dissolvido em água bidestilada. O CMH (*spin probe*) foi preparado na concentração de 10 mM dissolvido em KHB contendo 25 mM de deferoxamina, um quelante de ferro (Cat. DF - NOX-9, Noxygen) e 5 mM trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (Cat. DETC - NOX-10, Noxygen), quelante de cobre. As soluções foram mantidas a 4° C durante o decorrer dos experimentos.

Para a quantificação de EROs das culturas primárias de GRDs, as amostras foram coletadas de duas maneiras:

- Amostras coletadas em meio de cultura: 20 minutos antes de completar o tempo total dos tratamentos, foi adicionado 400 µM de CMH no meio de cultura e, após esse período, os sobrenadantes foram coletados e imediatamente congelados a 77K (equivalente a -196°C) em nitrogênio líquido;
- Amostras coletadas em tampão Krebs-HEPES: 1 hora antes de completar o tratamento, o sobrenadante foi removido e às culturas foi adicionado tampão Krebs-HEPES por 1 hora com os respectivos tratamentos. 20 minutos antes de completar o tempo total dos tratamentos, foi adicionado 400 µM de CMH no

tampão, após esse período, os sobrenadantes foram coletados e imediatamente congelados a -196°C em nitrogênio líquido.

Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até que as medidas em EPR fossem realizadas.

As amostras congeladas foram transferidas para tanque de nitrogênio líquido. Todas as medidas de EPR foram realizadas à temperatura de nitrogênio líquido (77 K , equivalente a -196°C) em um espectrômetro EMX plus, (Bruker, Billerica, Alemanha), utilizando a banda X ($9,35\text{ GHz}$), potência 2 mW e campo de modulação de 200 Gauss , constante de tempo de 10 ms , tempo de varredura de 600 G e 5 varreduras adicionados em conjunto para cada medição. Os parâmetros e a análise dos dados foram baseados em metodologia padronizada e adaptados de acordo com as necessidades do nosso estudo (SANTOS *et. al.*, 2018; MELLO *et. al.*, 2022).

Todos os ensaios dessa quantificação de EROs foram conduzidos no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

3.11.2. Mensuração de EROs por fluorimetria

A segunda técnica de quantificação de EROs utilizada nesse trabalho se baseia na fluorescência do produto do 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Uma vez em meio intracelular, esse reagente sofre desesterificação e tal produto emite fluorescência após oxidação, passível de quantificação em fluorímetro. Para realizar essa quantificação seguimos protocolo de Wang e Joseph (1999) com pequenas modificações. Utilizamos células PC-12 diferenciadas como modelo de neurotoxicidade. Assim, em cada poço de uma placa de 24 poços pré-tratada com poli-L-lisina (PLL – Cat. n. 1274) foram semeadas 200.000 células PC-12 em meio RPMI completo. Após 24 horas, o meio RPMI foi substituído pelo meio de diferenciação (MD) em que as células ficaram incubadas por mais 24 horas. Meio de diferenciação consiste em meio F12 (Gibco) suplementado com 1% de soro de cavalo inativado por calor, $1,0\text{ mM}$ de Piruvato de sódio, $50\text{ }\mu\text{M/mL}$ de penicilina e estreptomicina e 100 ng/mL de NGF. Passado esse período, as células foram tratadas em MD com extrato de *E. dysenterica* por 23,5 horas, lavadas com PBS1X e

incubadas por 30 minutos com 100 μ M de DCFH-DA a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após remover o reagente, as células foram incubadas com o extrato de *E. dysenterica* e cisplatina por mais 1 hora em PBS 1X, para que evitasse a leitura de fluorescência emitida por componentes potencialmente fluorescentes presente nos meios de cultura. Em seguida, a fluorescência emitida foi então quantificada em leitor de placas HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Synergy) onde a emissão foi feita no comprimento de onda de 485 nm e a leitura em 535 nm. Assim, a quantidade EROs corresponde a fluorescência emitida.

3.12. DIFERENCIAÇÃO CELULAR E ANÁLISE DE NEURITOS

Para avaliar a neurotoxicidade por meio da quantificação de neuritos, células PC-12 foram primeiramente diferenciadas em células *neuron-like* utilizando meio de diferenciação por 24 horas.

O plaqueamento foi feito em placas de 24 poços (200 mil células por poço) em meio RPMI 1640 por 24 horas em placas previamente tratadas com colágeno IV (Cat. n. C5533) para que ocorra a adesão das células a serem diferenciadas. Após esse período, as células foram diferenciadas por 24 horas e foram consideradas diferenciadas células que apresentaram pelo menos um neurito com comprimento igual ou maior que o diâmetro do corpo celular. Foram fotografados de 2 a 4 campos de visão/poço diferentes 24 horas após os tratamentos com cisplatina e extrato de *E. dysenterica*. Tais imagens foram obtidas em microscópio de contraste de fase invertida (aumento de 400×) e as análises morfológicas foram feitas de forma cega quanto às variáveis. A quantificação foi realizada usando o *software* de imagem *Image J*®.

3.13. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

(CONCEA), seguindo a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INFORMAÇÃO, 2013a).

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade de Brasília, Brasil (Protocolo número 51793/2014 e 23106.106926/2021-68 – anexo 1), de acordo com o *ARRIVE Guideline* (KILKENNY *et al.*, 2010). Nos EUA, o estudo foi aprovado pelo *Animal Care and Use Committee da Indiana University School of Medicine*, Indianapolis (protocolo número 20098).

As Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA foram utilizadas como referência para a eutanásia dos animais utilizados nesse estudo (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INFORMAÇÃO, 2013b).

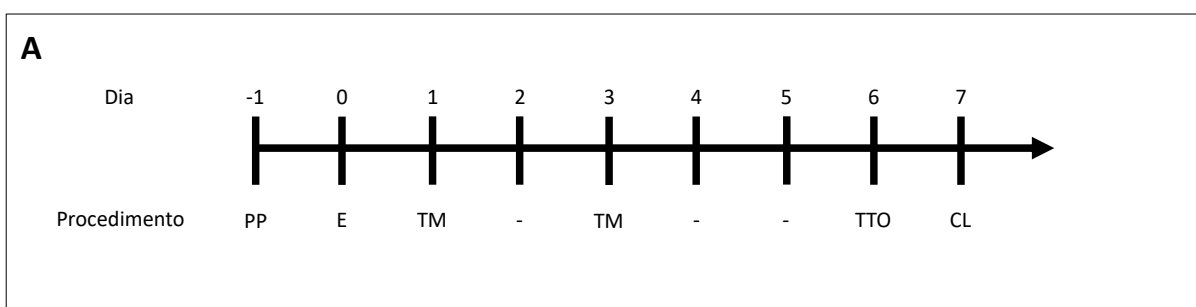
3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados, bem como suas distribuições, foram analisados pelo software Graphpad PRISM versão 8 (GraphPad Software para Mac, San Diego, CA). Nos ensaios cujas distribuições dos valores das amostras foram paramétricas, os resultados foram apresentados como média do $n \pm$ erro padrão da média (*standard error of the mean* - SEM). Diferenças das médias entre os grupos foram analisadas pela análise de variância (ANOVA), seguidos de pós teste de Dunn ou teste de múltiplas comparações de Turkey, quando aplicável. Os resultados daqueles ensaios cujos dados possuíam distribuições dos valores não-paramétricos foram apresentados como média do $n \pm$ *range*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os ensaios aqui apresentados foram realizados com pelo menos 2 experimentos independentes, sendo estes, culturas celulares realizadas em dias diferentes proveniente de animais diferentes ou placas distintas de cultura células *neuron-like* ou A549, sendo cada experimento independente considerado um “n” experimental.

4. RESULTADOS

4.1. O EXTRATO DE *E. dysenterica* NÃO ALTERA A VIABILIDADE CELULAR EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS DE GRDs

De acordo com a ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity de 2009, pode-se considerar um composto citotóxico quando esse reduz a viabilidade celular em no mínimo 30%. Assim, para verificar a citotoxicidade do extrato de *E. dysenterica* e cisplatina, realizamos uma curva de concentração-efeito nas culturas primárias de células de GRDs e avaliamos a viabilidade dessas células. As células foram cultivadas por 7 dias e no 6º receberam o tratamento com o extrato ou a cisplatina por 24 horas, como pode ser observado no esquema abaixo (figura 5 – A). Observamos que o tratamento em todas as concentrações testadas do extrato (3 e 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$) ou da cisplatina (3, 10 e 30 μM) não induziram redução maior do que 30% da viabilidade celular (figura 5 – B e C). Nos experimentos com cisplatina o controle negativo foi feito com água destilada e aqueles com *E. dysenterica*, o controle negativo foi 0,1% de DMSO.



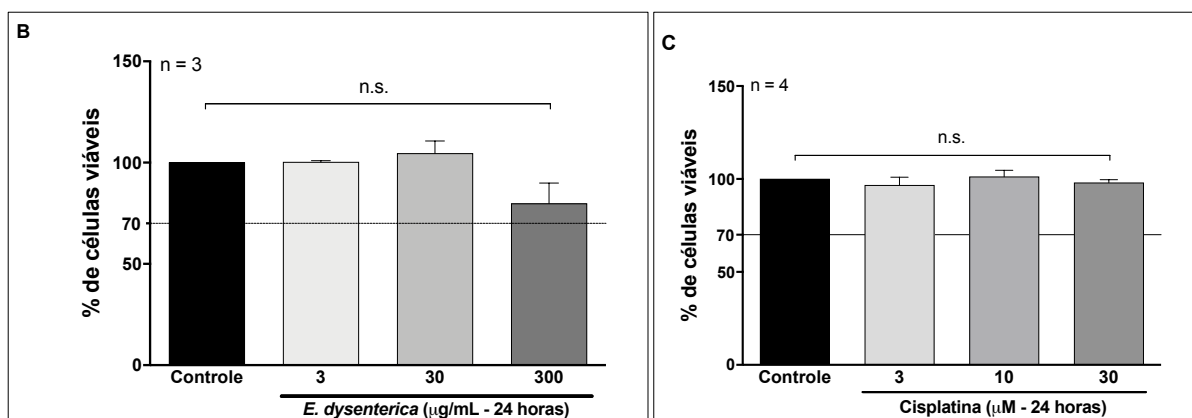


Figura 5. Viabilidade celular da cultura primária de células de GRDs tratada com extrato de *E. dysenterica*. **A.** Representação esquemática do desenho experimental para os ensaios de viabilidade celular. PP: preparo da placa de cultura, E: Eutanásia do animal, coleta, processamento e plaqueamento das células, TM: troca do meio de cultura, TTO: tratamento (s) e CL: coleta das amostras. **B.** As células foram tratadas no 6º dia de cultura por 24 horas com concentrações crescentes do extrato de *E. dysenterica* (3, 30 e 300 µg/mL) e a viabilidade foi avaliada por intermédio da exclusão com azul de tripano. **C.** As células foram tratadas no 6º dia de cultura por 24 horas com concentrações crescentes de cisplatina (3, 10 e 30 µM) e a viabilidade foi avaliada por intermédio do método de exclusão por azul de tripano. Os dados foram expressos como média ± SEM, n = 3-4 em cada grupo, n.s.: não significante.

4.2. O EXTRATO DE *E. dysenterica* NÃO ALTERA O EFEITO ANTITUMORAL DA CISPLATINA EM CÉLULAS A549

Uma vez que verificamos que o extrato de *E. dysenterica* não é considerado citotóxico nas culturas primárias de células de GRDs nas concentrações testadas, verificamos se o tratamento com o mesmo extrato modularia o efeito antitumoral da cisplatina. Assim, primeiramente realizamos uma curva concentração-efeito de cisplatina nas culturas de células A549 (linhagem celular de carcinoma epitelial) para determinar a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em mais de 30%. Como pode ser observado na figura 6 - A, o tratamento com cisplatina por 24 horas nas menores concentrações (3 e 30 µM) não induziu redução na viabilidade celular, entretanto, nas maiores concentrações testadas (100 e 300 µM) houve redução de viabilidade em 33,3 e 39,6%, respectivamente. Uma vez estabelecidas concentrações citotóxicas da cisplatina, o próximo passo foi investigar se o extrato também possuía atividade antitumoral, dessa forma, uma curva concentração-efeito do extrato de *E. dysenterica* foi confeccionada (figura 6 - B). Observamos uma redução de 23,1% na viabilidade celular na maior concentração testada (300 µg/mL). Com todas as curvas

concentração-efeito realizadas, realizamos um cotratamento com o antitumoral e o extrato. Assim, fizemos um pré-tratamento com 30 $\mu\text{g/mL}$ do extrato por 30 minutos nas culturas de células A549 e logo em seguida, adicionamos 30 e 100 μM de cisplatina e após 24 horas realizamos o ensaio de viabilidade celular. Observamos que a presença do extrato não alterou a atividade antitumoral da cisplatina nessas células, como pode ser observado na figura 6 – C.

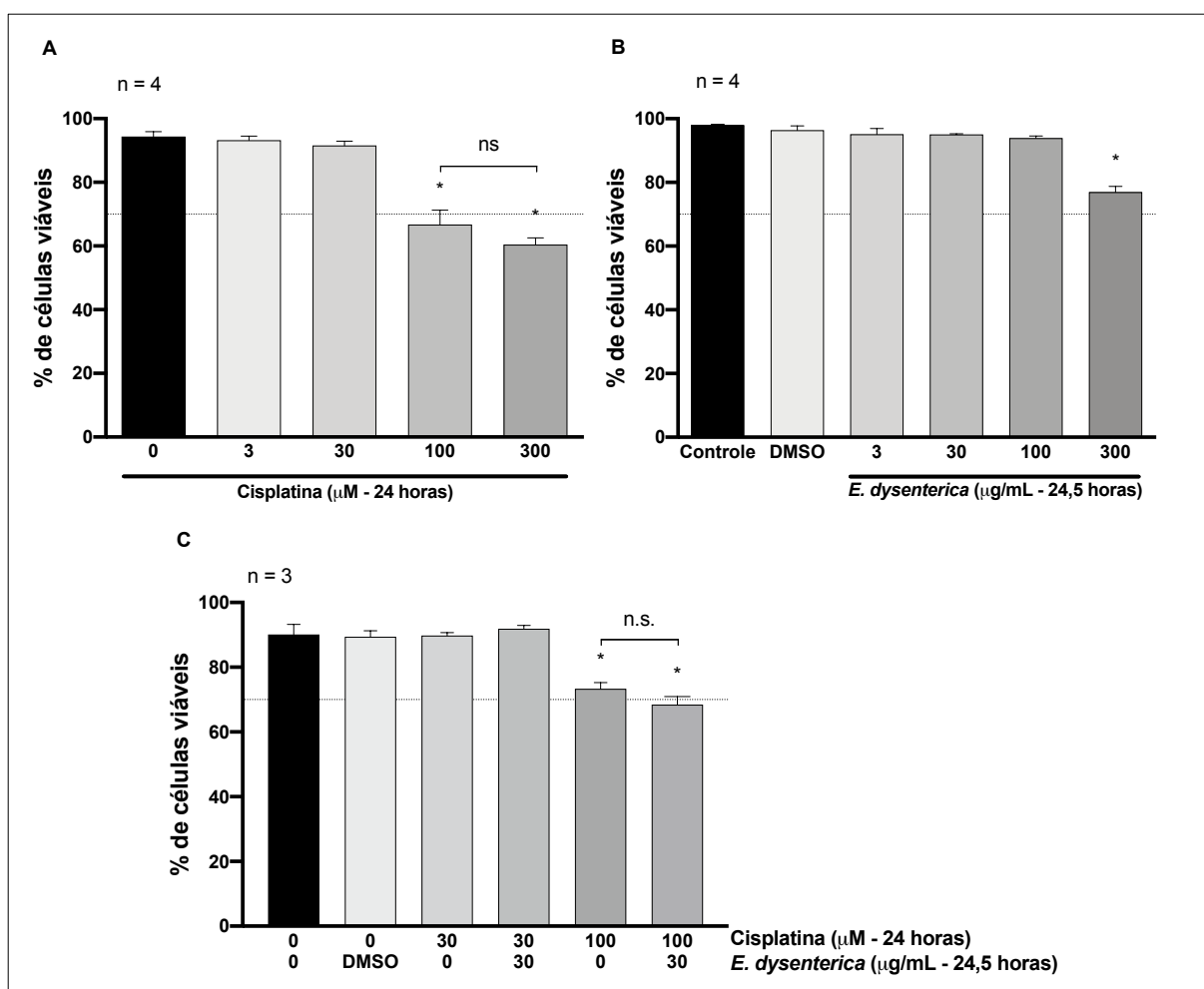


Figura 6. O extrato de *E. dysenterica* não altera a atividade antitumoral da cisplatina em cultura de células A549. Células A549 foram plaqueadas em placas de 24 poços e após 24 horas, foram tratadas com cisplatina, extrato de *E. dysenterica* e/ou a combinação de ambos os tratamentos e a viabilidade foi avaliada por intermédio do método de exclusão por azul de tripano. **A.** Curva concentração-efeito de cisplatina (3, 30, 100 e 300 μM) em células A549 tratadas por 24 horas. **B.** Curva concentração-efeito de extrato de *E. dysenterica* (3, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) em células A549 tratadas por 24,5 horas. **C.** Cotratamento com cisplatina (30 e 100 μM) e extrato de *E. dysenterica* (30 $\mu\text{g/mL}$) realizado por 24 horas em células A549. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM, $n = 3-4$ em cada grupo, $*p < 0,05$ vs controle, n.s.: não significante.

4.3. A CISPLATINA POSSUI EFEITO DUAL SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs

Para avaliar alterações funcionais em neurônios periféricos após o tratamento com cisplatina, foi realizado ensaio de liberação de CGRP. Para isso, no 6º dia de cultura, as culturas de primárias de células de GRDs foram tratadas por 24 horas com cisplatina nas seguintes concentrações: 1, 3, 10, 30 e 100 μ M (figura 7 – A). O grupo controle foi feito com água destilada, diluente da cisplatina.

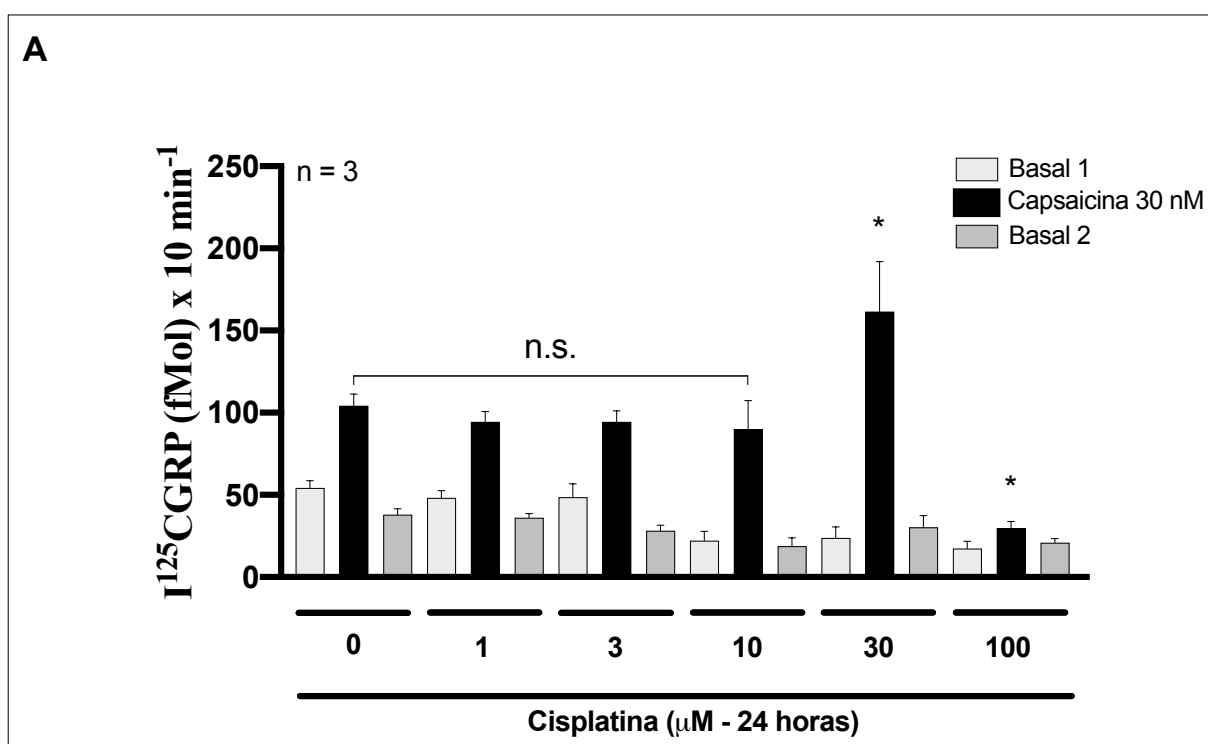
Usamos como estímulo para esse experimento a capsaicina na concentração de 30 nM. Dessa forma, os neurônios em cultura foram despolarizados devido a abertura de canais de cátions por agonismo dos receptores TRPV1. Como consequência desta despolarização, há liberação de CGRP, quantificado aqui por RIA.

Em todos os resultados mostrados a seguir as barras cinza-claros representam a quantidade basal de CGRP liberada nas culturas primárias de células de GRDs sem estímulo, as barras pretas representam a quantidade de CGRP liberada após o estímulo com 30 nM de capsaicina e as barras cinza-escuros representam a quantidade basal de CGRP liberada sem estímulo e após a exposição do agente despolarizador, assegurando a viabilidade celular.

Na figura 6 - A, observamos que a exposição à capsaicina induziu liberação de CGRP em todos os tratamentos realizados, indicando a responsividade das células ao estímulo despolarizante. Observa-se também que não houve alteração na liberação de CGRP após o tratamento com cisplatina nas menores concentrações utilizadas (1, 3 e 10 μ M). Entretanto, podemos observar uma resposta modulatória dual nas duas maiores concentrações testadas (30 e 100 μ M), em que a cisplatina induziu aumento da resposta à capsaicina em 53,9%, enquanto o tratamento com 100 μ M induziu diminuição da resposta à capsaicina (71,6%). Após a exposição à capsaicina, a liberação de CGRP retornou aos níveis basais e a cisplatina não alterou esta resposta, indicando que não houve alteração permanente da função neuronal.

Na figura 7 - B, observarmos os efeitos modulatórios da cisplatina em relação ao conteúdo total de CGRP. Realizar esse experimento é importante para explicar potenciais efeitos de fármacos na síntese de neuropeptídeos, uma vez que a síntese

e a liberação de neuropeptídeos são eventos distintos. Observamos que, assim como no experimento de liberação de CGRP, as menores concentrações testadas não induziram alteração nos níveis totais de CGRP, porém, 30 μ M de cisplatina induz diminuição da quantidade total de CGRP em 44,8%, assim como o tratamento com 100 μ M, que reduz a quantidade de CGRP total em 71,8%.



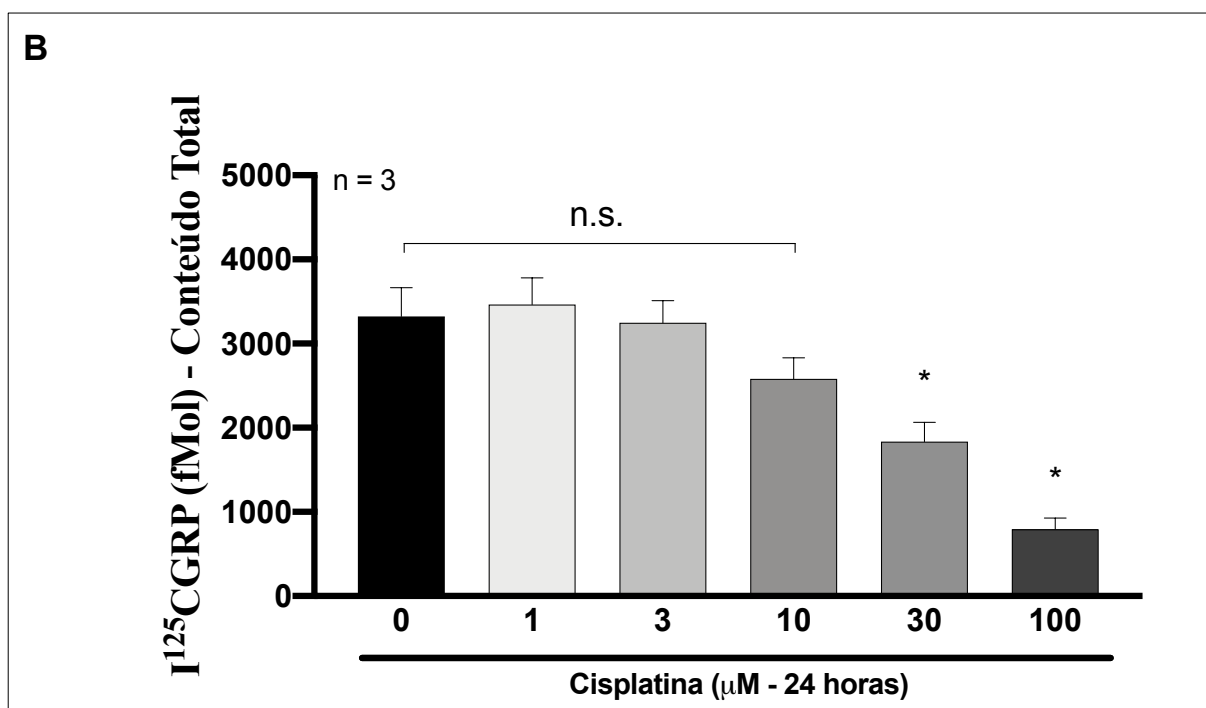


Figura 7: Cisplatina induz resposta dual na liberação de CGRP em cultura primária de células de GRDs estimulada com capsaicina. A. As culturas primárias de células de GRDs foram tratadas por 24 horas com 1, 3, 10, 30 e 100 μM de cisplatina. Cada coluna representa a média ± SEM dos valores basais de CGRP liberado (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros) quantificado por RIA. **B.** Conteúdo total de CGRP das culturas tratadas com 1, 3, 10, 30 e 100 μM de cisplatina por 24 horas. Os dados foram expressos como média ± SEM, n = 3 em cada grupo, *p<0,05 vs controle, n.s.: não significativo.

4.4. O EXTRATO DE *E. dysenterica* INDUZ DIMINUIÇÃO DA LIBERAÇÃO DE CGRP EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs

Para avaliar o potencial efeito neuroprotetor do extrato de *E. dysenterica* na toxicidade induzida por cisplatina, primeiro investigamos quais os efeitos do extrato na funcionalidade neuronal, através da liberação de CGRP. Assim, no 6º dia de cultura, as células foram tratadas por 24 horas com extrato de *E. dysenterica* nas concentrações de 0,3, 3, 30 e 300 μM (figura 8 – A). O extrato foi diluído em DMSO (0,1%), sendo esse, portanto, um dos controles do experimento. Como mostrado na figura 8 – B, as células foram responsíveis ao estímulo despolarizante (capsaicina) e nenhum dos tratamentos induziu diferenças nas respostas basais. Observa-se que o diluente não alterou a resposta à capsacina, bem como com as concentrações de 0,3

e 3,0 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *E. dysenterica*. Entretanto, podemos observar uma redução de 37,6% na liberação de CGRP quando as células foram tratadas com 30 $\mu\text{g/mL}$, e interessante, a maior concentração testada não induziu alteração estatisticamente significativa. Os níveis de CGRP totais não foram alterados nos tratamentos testados (figura 8 – C)

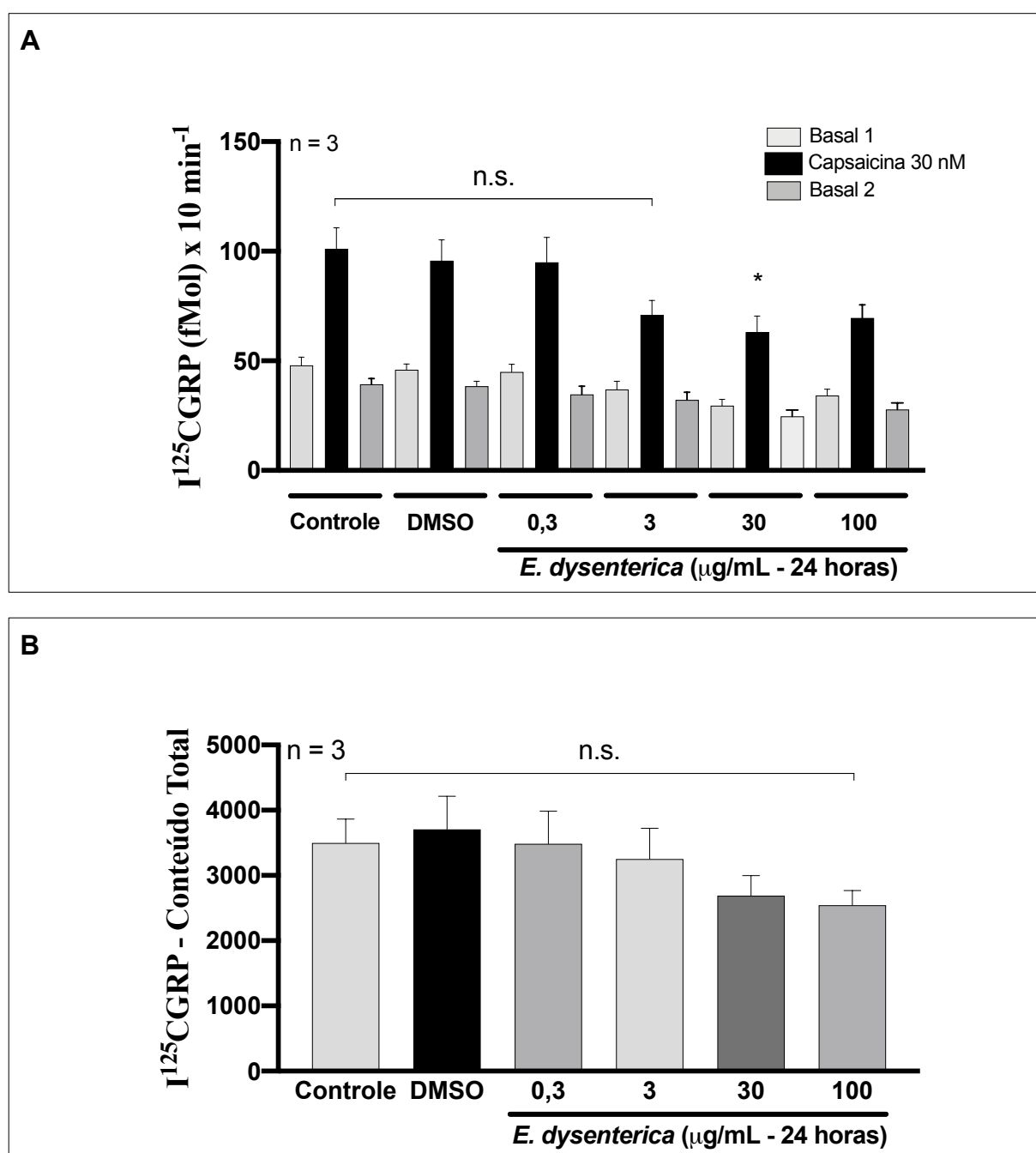


Figura 8: O extrato de *E. dysenterica* reduz a liberação de CGRP sem alterar sua quantidade total em cultura primária de células de GRDs estimulada com capsaicina. A. As culturas primárias de

células de GRDs foram tratadas por 24 horas com 0,3, 3, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *E. dysenterica* e o CGRP liberado pelos neurônios sensoriais foi quantificado por RIA. Cada coluna representa a média $\pm$ SEM dos valores basais de CGRP liberado (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **B.** Conteúdo total de CGRP das culturas tratadas com 0,3, 3, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *E. dysenterica* por 24 horas. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM, $n = 3$ em cada grupo, $*p < 0,05$ vs controle, n.s.: não significativo. O grupo controle desse experimento foi feito apenas com o meio de cultura F12.

Para avaliar se a resposta observada é uma resposta de todos os neurônios que possuem CGRP ou específica à subpopulação de neurônios TRPV1 positivos, realizamos o mesmo tratamento com extrato, estimulamos os neurônios com 50 mM de KCl e avaliamos a liberação de CGRP. O KCl nessa concentração induz despolarização de todos os neurônios, sendo, portanto, um estímulo pan-neuronal. Dessa maneira, as células foram tratadas com o extrato no 6º dia de cultura do mesmo modo que o experimento anterior (figura 9 – A).

Como mostrado na figura 8 – A, as células foram responsíveis ao KCl (barras pretas) e nenhum dos tratamentos induziu diferenças nas respostas basais. Observa-se também que somente a maior concentração do extrato (100 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a liberação de CGRP pelos neurônios após o estímulo com KCl. A quantidade de CGRP liberada foi reduzida em 36,0%. O tratamento com o extrato também não induziu alteração nas conteúdo total de CGRP (figura 9 – B).

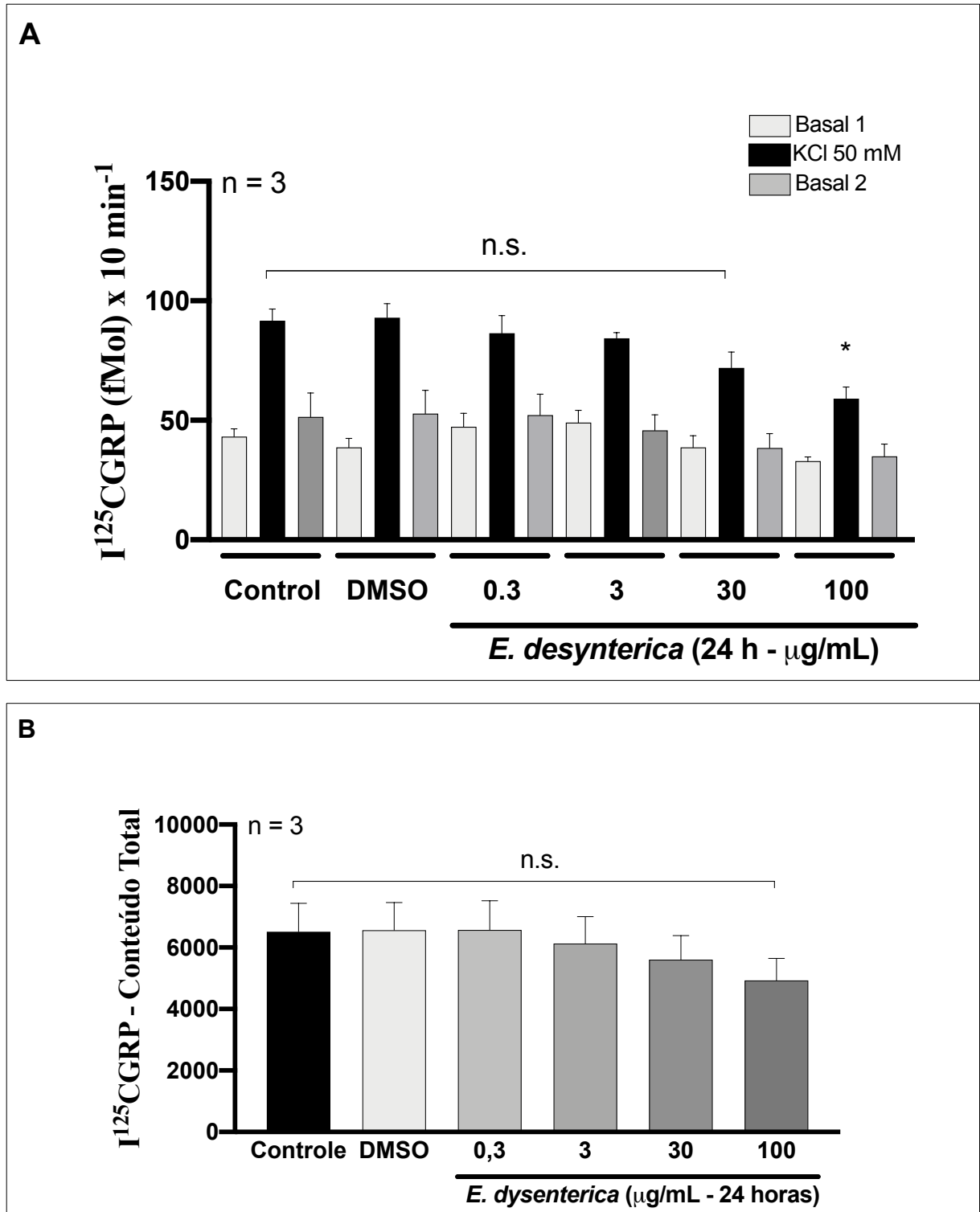
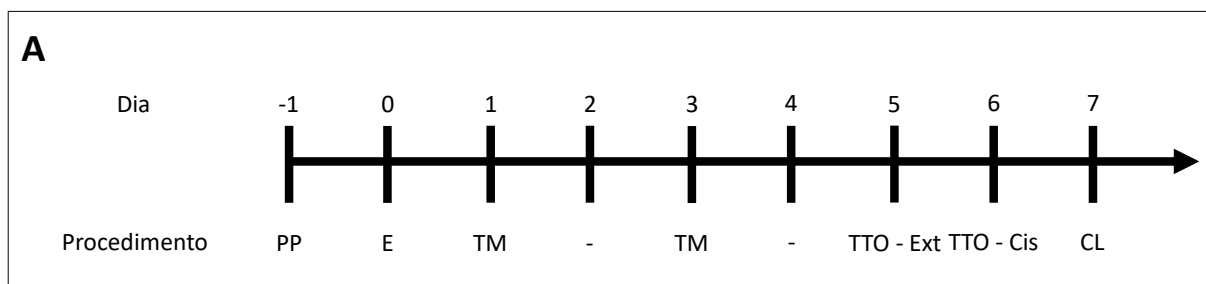


Figura 9: O extrato de *E. dysenterica* reduz a liberação de CGRP sem alterar sua quantidade total em cultura primária de células de GRDs estimulada com KCl. **A.** As culturas primárias de células de GRDs foram tratadas por 24 horas com 0,1% de DMSO ou 0,3, 3, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *E. dysenterica* e o CGRP liberado pelos neurônios sensoriais foi quantificado por RIA. Cada coluna representa a média $\pm$ SEM dos valores de CGRP liberado em condições basais (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **B.** Conteúdo total de CGRP das culturas tratadas com 0,3, 3, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *E. dysenterica* por 24 horas. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM, n = 3 em cada grupo, n.s.: não significativo. O grupo controle desse experimento foi feito apenas com o meio de cultura F12.

4.5. O EXTRATO DE *E. dysenterica* PREVINE OS EFEITOS NEUROTÓXICOS DA CISPLATINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs E ESTE EFEITO É DEPENDENTE DE TEMPO

Uma vez definida a concentração do extrato de *E. dysenterica* a ser utilizada, realizamos um experimento piloto com a finalidade de avaliar se o potencial efeito protetor do extrato em relação à toxicidade do quimioterápico era tempo-dependente. Assim, fizemos uma curva concentração-efeito com o extrato e a cisplatina. Para isso, culturas primárias de células de GRDs foram tratadas com 30 µg/mL do extrato de *E. dysenterica* por 24 horas antes de acrescentar o tratamento de 30 µM de cisplatina, que também compreendia 24 horas, como demonstrado na figura 10 – A. Observamos que embora as células tenham respondido ao estímulo despolarizante, a cisplatina não alterou a resposta à capsaicina (i.e aumentar a liberação de CGRP) como nos experimentos anteriores, o que inviabilizou a análise desse experimento (figura 10 – B).



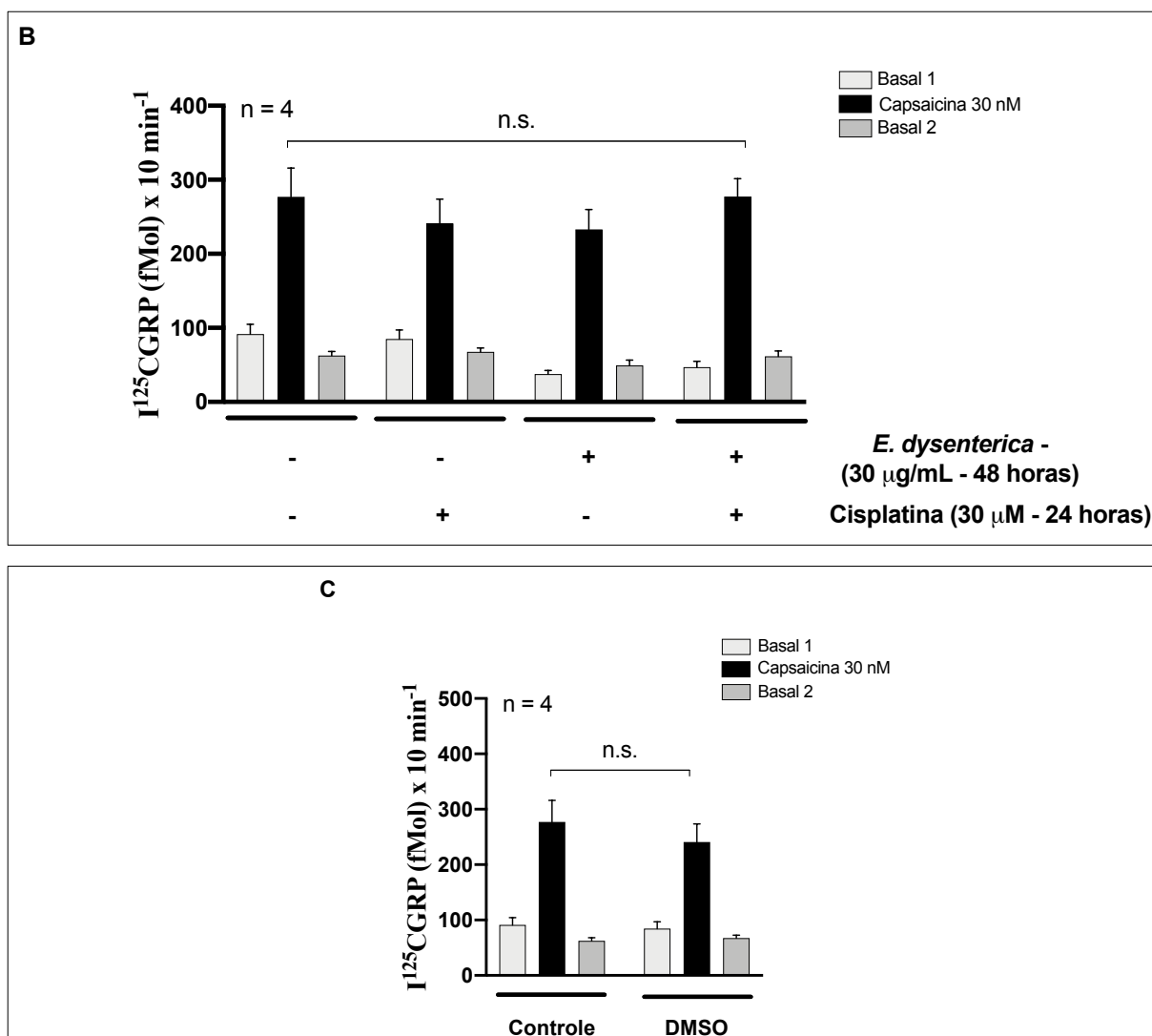
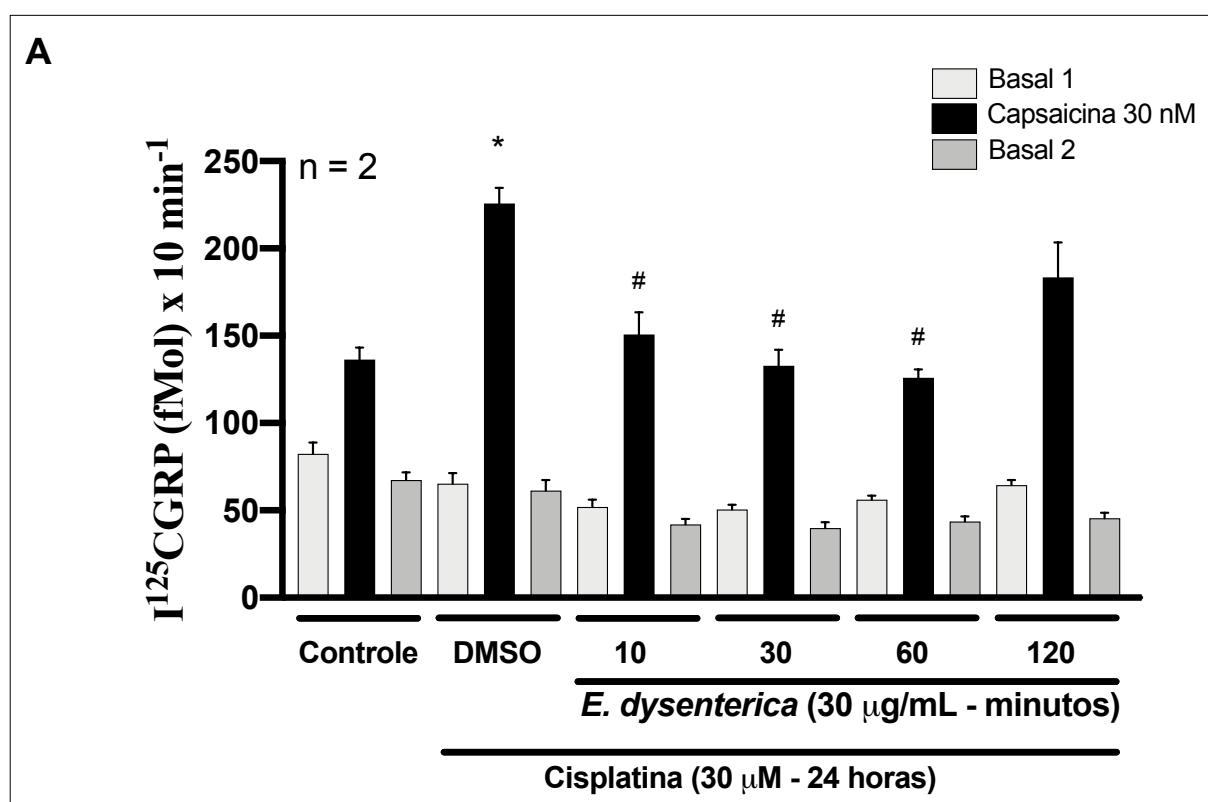


Figura 10. Determinação da liberação de CGRP induzida pelo pré-tratamento com extrato de *E. dysenterica* seguido do tratamento com cisplatina em cultura primária de GRDs estimulada com capsaicina. **A.** Representação esquemática do desenho experimental para os experimentos de liberação de CGRP. PP: preparo da placa de cultura, E: Eutanásia do animal, coleta, processamento e plaqueamento das células, TM: troca do meio de cultura, TTO – Ext: pré-tratamento com o extrato, TTO – Cis: Tratamento com cisplatina + Extrato e CL: coleta das amostras. **B.** As culturas primárias de células de GRDs foram previamente tratadas com 30 µg/mL do extrato de *E. dysenterica* por 24 horas e posteriormente receberam o tratamento com 30 µM de cisplatina. O CGRP liberado pelos neurônios sensoriais foi quantificado por RIA. **C.** O CGRP liberado pelos neurônios sensoriais foi quantificado por RIA. Cada coluna representa a média ± SEM dos valores relativos ao conteúdo de CGRP liberado em condições basais (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). O grupo controle desse experimento foi feito apenas com o meio de cultura F12.

Diante da ausência de resposta da cisplatina, decidimos mudar o lote do fármaco e fizemos um experimento mais curto para verificar se o pré-tratamento com o extrato poderia ser realizado num intervalo inferior a 24 horas. Desta maneira,

culturas primárias de células de GRDs foram pré-tratadas com o extrato por 10, 30, 60 ou 120 minutos e posteriormente, adicionamos cisplatina em uma concentração final de 30 μ M, e 24 horas depois, realizamos o experimento. Na figura 11 – A observamos que as células foram responsivas ao estímulo com capsaicina. Também é possível observar que o tratamento com a cisplatina induziu aumento de 63,3% na liberação de CGRP, como observado anteriormente, e os pré-tratamentos com o extrato por 10, 30 e 60 minutos preveniram o aumento da liberação de CGRP induzida pela cisplatina, uma vez que reduziram esse aumento da cisplatina em 33,2%, 41,2% e 44,2%, respectivamente. Diferentemente dos pré-tratamentos mais curtos com o extrato, o pré-tratamento realizado por 120 minutos antes do tratamento neurotóxico não preveniu o efeito mediado pela cisplatina. Reforçando os achados dos experimentos anteriores, o extrato não foi capaz de alterar a quantidade total de CGRP reduzida pela cisplatina (redução de 38,6%) em nenhuma das condições testadas (figura 11 – B).



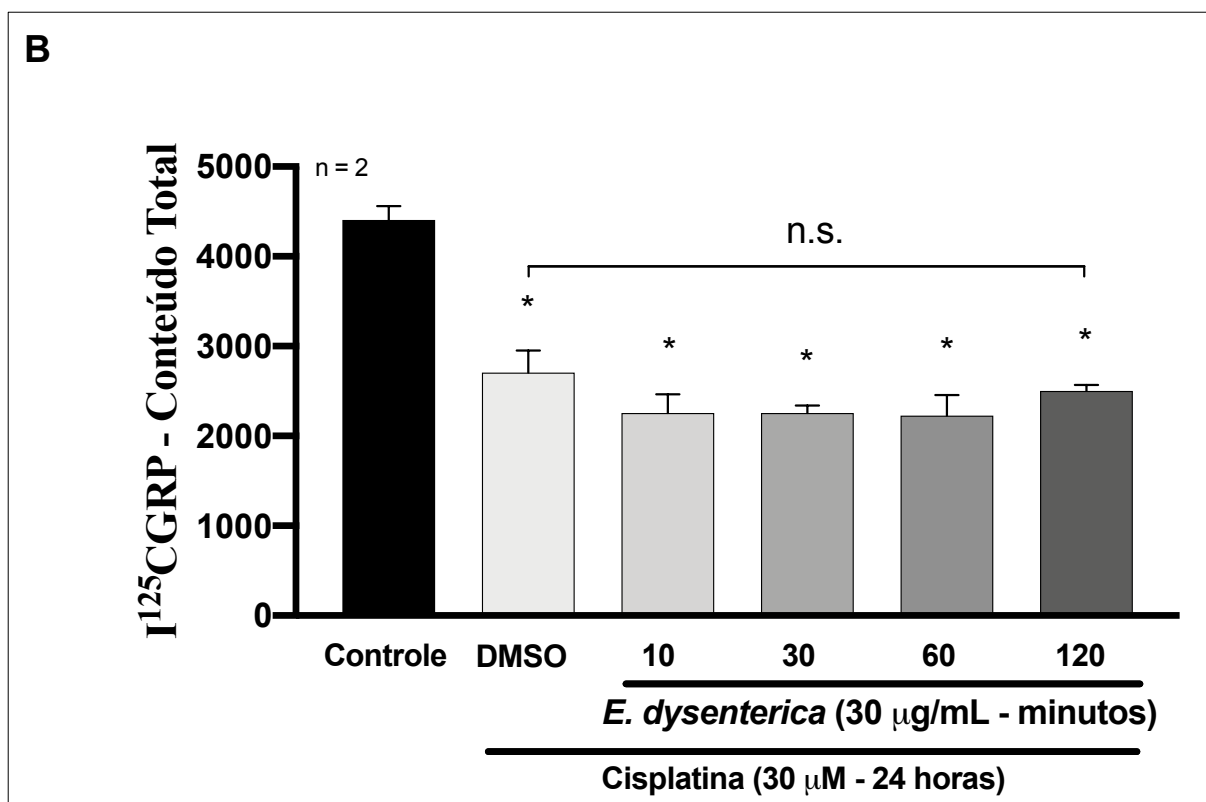
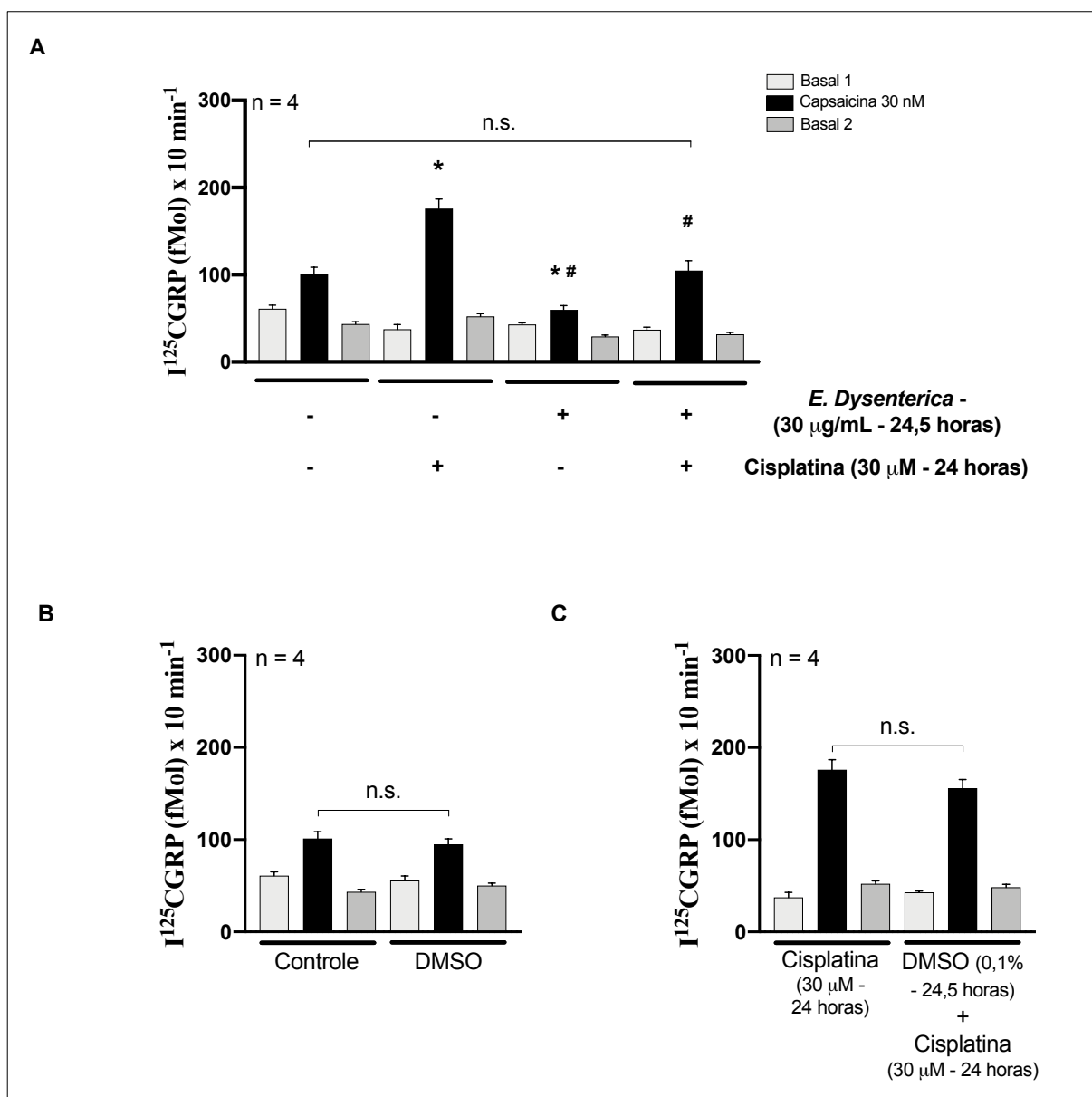


Figura 11. O extrato de *E. dysenterica* previne o aumento da liberação de CGRP induzida pela cisplatina sem alterar sua quantidade total em cultura primária de células de GRDs estimulada com capsaicina de maneira dependente de tempo. **A.** As culturas primárias de células de GRDs foram previamente tratadas com 30 µg/mL do extrato de *E. dysenterica* por diferentes tempos (10, 30, 60 ou 120 minutos) antes de receberem o tratamento com 30 µM de cisplatina. O CGRP liberado pelos neurônios sensoriais foi quantificado por RIA. Cada coluna representa a média $\pm$ SEM dos valores basais de CGRP liberado (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **B.** Conteúdo total de CGRP das culturas pré-tratadas com 30 µg/mL do extrato de *E. dysenterica* por diferentes tempos antes de serem co-tratadas com cisplatina por mais 24 horas. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM, n = 2 em cada grupo, *p<0,05 vs controle, n.s.: não significativo. Os grupos controle desses experimentos foram feitos apenas com o meio de cultura F12.

Para dar sequência aos experimentos decidimos por utilizar o tempo de 30 minutos. Observamos que nas condições apresentadas (cotratamento de extrato de *E. dysenterica* e cisplatina), as células responderam ao estímulo com capsaicina, e nenhum dos tratamentos induziu alteração na resposta basal dos neurônios (figura 12 – A). Também observamos que a liberação de CGRP aumentou em 74,0% devido ao tratamento com cisplatina apenas e reduziu em 40,9% com o tratamento com o extrato sozinho, como observado nos experimentos anteriores. Além disso, demonstramos que o pré-tratamento com o extrato reduziu a toxicidade da cisplatina quanto à liberação de CGRP (reduziu o aumento induzido pela cisplatina em 59,7%).

Com relação ao total de CGRP nas amostras, observamos que o tratamento com o extrato não preveniu a alteração induzida pela cisplatina, como representado na figura 12 – D. O pré-tratamento com DMSO (0,1%) não modulou as alterações em comparação com o controle (figura 12 – B) ou induzidas pela cisplatina (figura 12 – C).



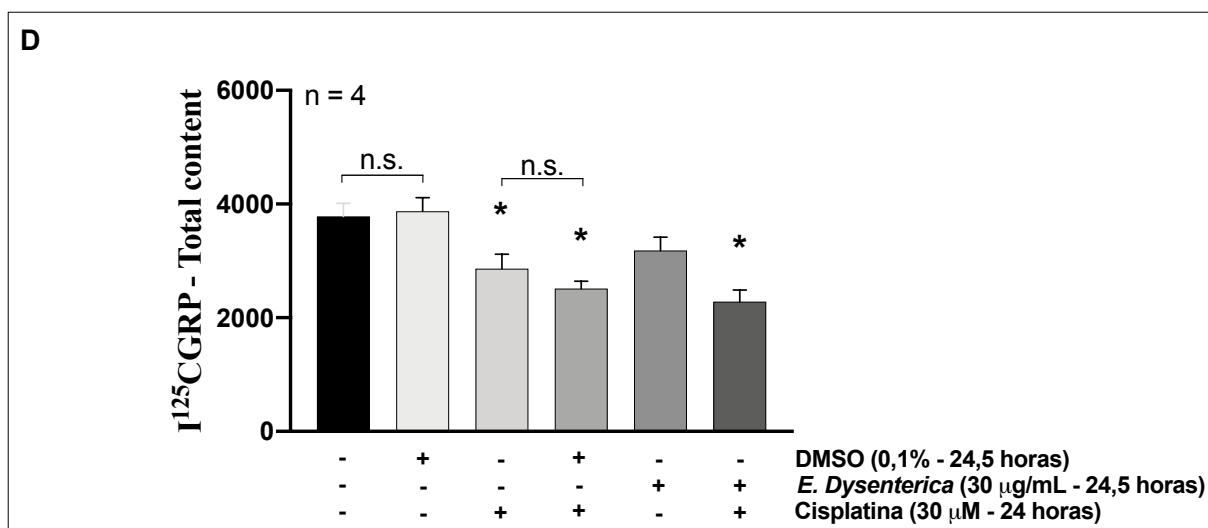
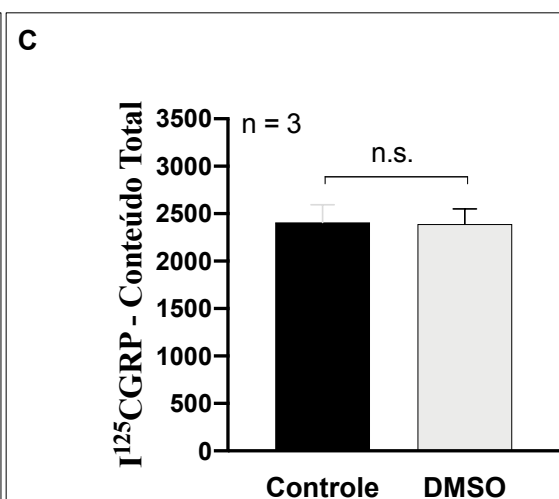
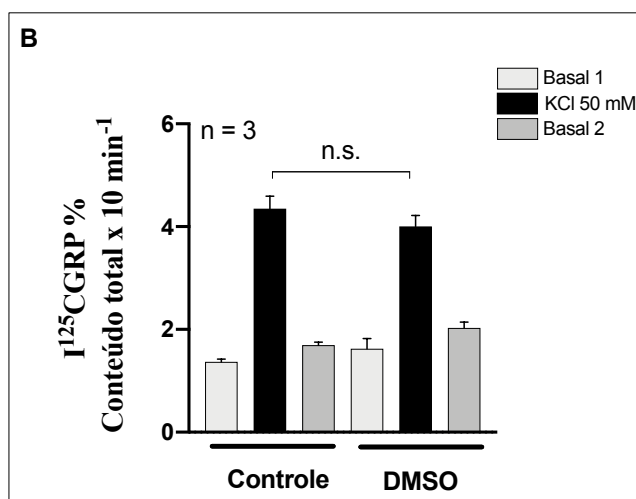
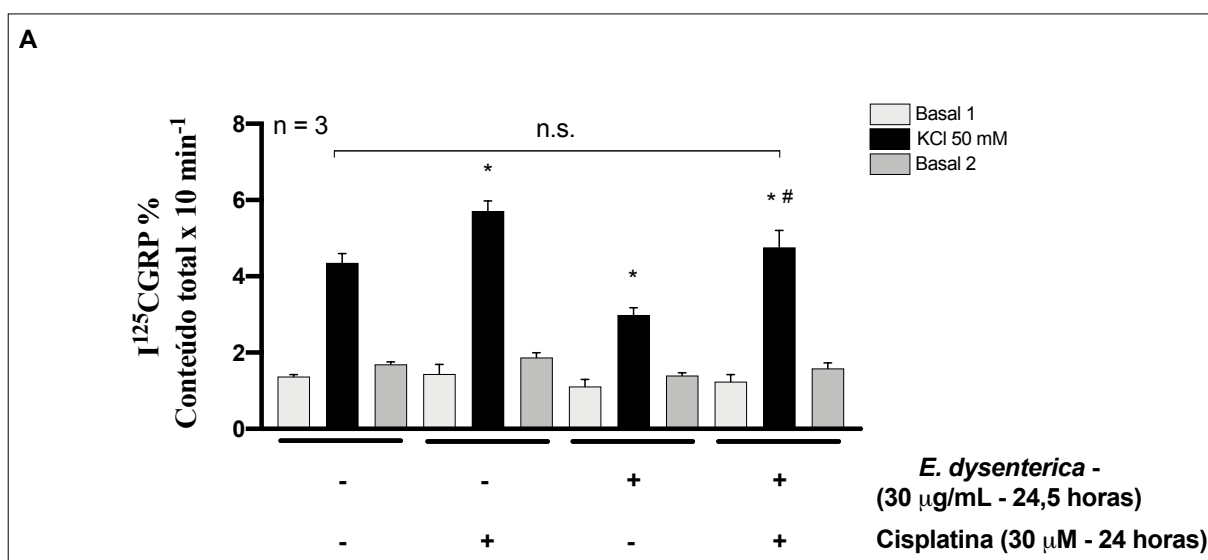


Figura 12. O extrato de *E. dysenterica* previne o aumento da liberação de CGRP induzida pela cisplatina em cultura primária de células de GRDs estimuladas com capsaicina. **A.** As culturas primárias de células de GRDs foram previamente tratadas com 30 µg/mL do extrato de *E. dysenterica* por 30 minutos e posteriormente receberam o tratamento com 30 µM de cisplatina. O CGRP liberado pelos neurônios sensoriais foi quantificado por RIA. Cada coluna representa a média ± SEM dos valores basais de CGRP liberado (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **B.** CGRP liberado de culturas primárias de células de GRDs sem tratamento (meio F12) vs culturas previamente tratadas com 0,1% de DMSO por 30 minutos e posteriormente com 1% de água. Cada coluna representa a média ± SEM dos valores basais de CGRP liberado (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **C.** Comparação entre o CGRP liberado de culturas primárias de células de GRDs previamente tratadas com 0,1% de DMSO por 30 minutos e posteriormente com 30µM de cisplatina *versus* culturas primárias de células de GRDs previamente tratadas com 30 µM de cisplatina somente. Cada coluna representa a média ± SEM dos valores basais de CGRP liberado (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **D.** Conteúdo total de CGRP das culturas primárias de células de GRDs sem tratamento, pré-tratadas com 0,1% de DMSO por 30 minutos e posteriormente com 6% de água por 24 horas, tratadas com 30 µM de cisplatina por 24 horas, pré-tratadas com 0,1% de DMSO por 30 minutos e posteriormente com 30 µM de cisplatina por 24 horas, tratadas com 30 µg/mL do extrato de *E. dysenterica* por 24,5 horas e pré-tratadas com 30 µg/mL do extrato de *E. dysenterica* por 30 minutos e posteriormente co-tratadas com cisplatina por mais 24 horas. Os dados foram expressos como média ± SEM, n = 4 em cada grupo, *p<0,05 vs controle, #p<0,05 vs cisplatina, n.s.: não significativo

Uma vez que determinamos os efeitos neuroprotetores do extrato da *E. dysenterica* contra a toxicidade da cisplatina em neurônios periféricos, investigamos se essa era uma resposta específica de uma subpopulação neuronal ou se uma resposta neuronal generalizada. Para isso, repetimos o tratamento anterior e expusemos as células a 50 mM de KCl para indução da liberação de CGRP. Na figura 13 – A, é possível observar que o agente despolarizador induziu a resposta esperada (aumento da liberação de CGRP, representada pelas barras pretas), assim como o tratamento com cisplatina induziu aumento da liberação de CGRP (33,3%). Ainda,

tratamento com o extrato de *E. dysenterica* reduziu essa resposta em 31,4% e o pré-tratamento com o extrato reduziu o efeito neurotóxico da cisplatina, uma vez que reduziu o aumento da liberação de CGRP em 17,9%. Não houve diferença entre os controles em relação a liberação de CGRP normalizada pelo conteúdo total (figura 13 – B). Quanto ao conteúdo total de CGRP, não houve diferença entre os controles (figura 13 – C). No entanto, a cisplatina não teve seu efeito neurotóxico (redução de 25,0% do conteúdo total de CGRP) modulado pelo pré-tratamento de 30 minutos com 30 μ M do extrato de *E. dysenterica*, em que a redução desse peptídeo foi de 31,9% (figura 13 – D).

Nesses experimentos, os dados foram apresentados como a porcentagem da razão da liberação de CGRP e o seu conteúdo total.



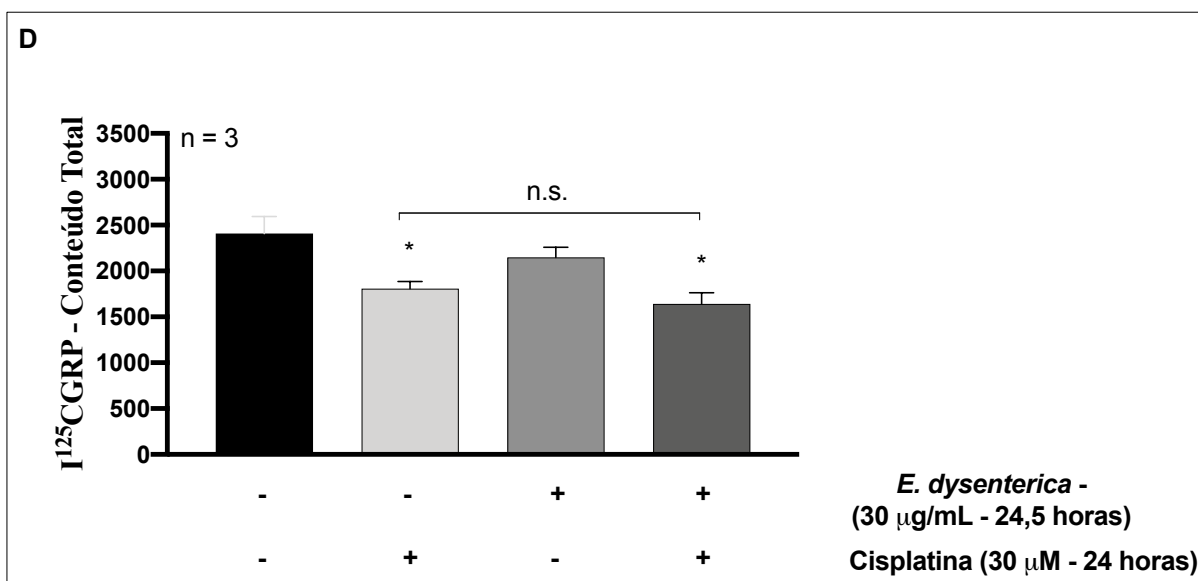


Figura 13. O extrato de *E. dysenterica* reduz o aumento da liberação de CGRP induzida pela cisplatina sem alterar sua quantidade total em cultura primária de células de GRDs estimulada com KCl. **A.** As culturas primárias de células de GRDs foram previamente tratadas com 30 μ g/mL do extrato de *E. dysenterica* por 30 minutos e posteriormente foram co-tratadas 30 μ M de cisplatina por 24 horas. O CGRP liberado pelos neurônios sensoriais foi quantificado por RIA. Cada coluna representa a média $\pm$ SEM dos valores basais de CGRP liberado (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **B.** Quantificação do CGRP liberado em culturas primárias de células de GRDs sem tratamento (meio F12) vs culturas previamente tratadas com 0,1% de DMSO por 24,5 horas. Cada coluna representa a média $\pm$ SEM dos valores basais de CGRP liberado (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **C.** Conteúdo total de CGRP de culturas primárias de células de GRDs sem tratamento (meio F12) vs culturas previamente tratadas com 0,1% de DMSO por 24,5 horas. **D.** Conteúdo total de CGRP das culturas primárias de células de GRDs sem tratamento, tratadas com 0,1% de DMSO por 30 minutos e posteriormente com 6% de água, tratadas com 30 μ g/mL do extrato *E. dysenterica* e pré-tratadas com 30 μ g/mL do extrato de *E. dysenterica* por 30 minutos e posteriormente co-tratadas com cisplatina por mais 24 horas. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM, $n = 3$ em cada grupo, * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs cisplatina, n.s.: não significante. O grupo controle desse experimento foi feito apenas com o meio de cultura F12.

4.6. O TRATAMENTO COM CISPLATINA INDUZ AUMENTO DA LIBERAÇÃO DE IL-1 β DE FORMA TEMPO-DEPENDENTE

Uma vez que demonstramos papel neuroprotetor do extrato em relação à sensibilização neuronal, investigamos se ela também ocorria pela atividade anti-inflamatória, visto que o extrato de *E. dysenterica* possui atividade anti-inflamatória descrita na literatura. Desse modo, em um primeiro momento, investigamos qual o efeito da cisplatina sobre a liberação de IL-1 β e para isso, no 6º dia de cultura foram

realizadas curvas tempo-resposta com duas concentrações diferentes desse fármaco (1 e 10 μM) nas culturas primárias de células de GRDs. Como pode ser observado na figura 14 – A, o tratamento com 1 μM de cisplatina induziu aumento da liberação de IL-1 β em comparação com o controle após 1, 2 e 6 horas de exposição do antitumoral de 50,5%, 60,9% e 41,5%, respectivamente. Esse tratamento por 24 horas não alterou os níveis de IL-1 β . O tratamento com 10 μM de cisplatina induziu aumento em todas as concentrações testadas, em que em 1 hora de exposição houve aumento de 35,5% na liberação de IL-1 β , em 2 horas de 58,3%, em 6 horas de 46,1% e em 24 horas de 33,8% em comparação com o controle (Figura 14 – B).

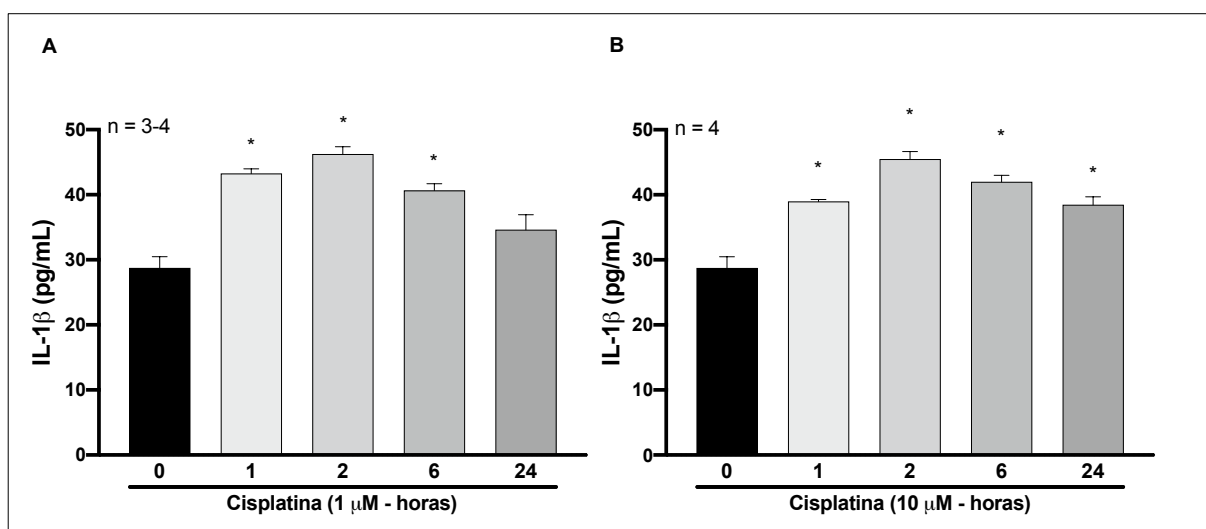


Figura 14: Curvas de tempo-resposta na liberação de IL-1 β de cultura primária de células de GRDs após o tratamento com cisplatina. As culturas primárias de células de GRDs foram tratadas com 1 ou 10 μM de cisplatina em diferentes tempos de exposição (1, 2 6 e 24 horas) e a quantidade de IL-1 β liberada foi mensurada por ELISA. **A.** IL-1 β liberada em meio F12 após tratamento de 1 μM de cisplatina em diferentes tempos exposição **B.** IL-1 β liberada em meio F12 após tratamento com 10 μM de cisplatina em diferentes tempos de exposição. Os dados representam a média $\pm$ SEM, n = 3 - 4 em cada grupo. Os grupos controle desses experimentos foram realizados apenas com meio de cultura F12.

O próximo passo foi testar a resposta celular frente ao tratamento com o extrato de *E. dysenterica*. Assim, verificamos a liberação de IL-1 β após o tratamento com concentrações crescentes por 24,5 horas do extrato (0,3, 3, 30 e 100 μM) nas culturas de células de GRDs. Como pode ser visto na figura 15, apenas o tratamento com 3 $\mu\text{g/mL}$ de extrato aumentou em 55,4% a liberação dessa citocina no meio de cultura. As demais concentrações não induziram modulação da liberação de IL-1 β .

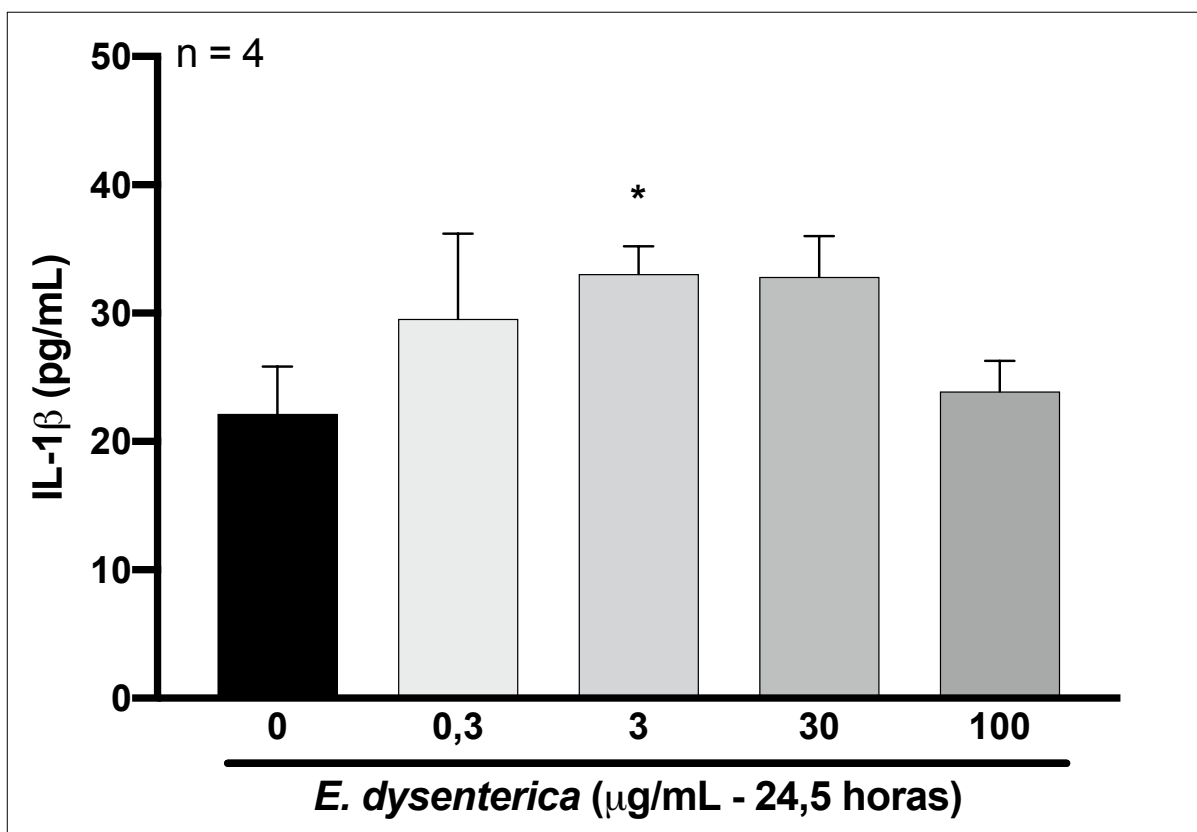


Figura 15. Curva de concentração-efeito na liberação de IL-1β de cultura primária células de GRDs após o tratamento com extrato de *E. dysenterica*. As culturas primárias de células de GRDs foram tratadas com diferentes concentrações de extrato de *E. dysenterica* (0,3, 3, 30 e 100 mg/mL) por 24,5 horas e a quantidade de IL-1β liberada foi mensurada por ELISA. Os dados representam a média $\pm$ SEM, n = 4 em cada grupo. O grupo controle desse experimento foi realizado com 0,1% de DMSO.

4.7. A CISPLATINA INDUZ ESTRESSE OXIDATIVO, QUE É PREVENIDO PELO PRÉ-TRATAMENTO COM EXTRATO DE *E. dysenterica*

Uma das hipóteses para a o desenvolvimento e estabelecimento da NPIQ é o estresse oxidativo. Assim, verificamos se o extrato poderia ser neuroprotetor no nosso modelo por meio da quantificação de EROs via ressonância paramagnética eletrônica. Primeiramente verificamos a produção de EROs em decorrência do tratamento com cisplatina. Para isso, construímos uma curva concentração-efeito, com concentrações crescentes de cisplatina (1, 3, 10, 30 e 100 μ M) tratadas por 24 horas em duas condições diferentes, em meio Krebs-HEPES e em meio F12. Como pode ser observado na figura 16 – A e B, nenhuma das concentrações testadas de cisplatina induziu aumento na quantidade de EROs liberadas nas culturas de GRDs após 24

horas de exposição. Uma vez que não foi possível observar nenhuma modulação em 24 horas, decidimos reduzir o tempo de tratamento, pois poderíamos não estar observando as EROs em decorrência da labilidade das espécies reativas, e então realizamos outra curva concentração-efeito com o tratamento por 1 hora. Como pode ser observado nas figuras 16 - C e D, em nenhuma das concentrações de cisplatina ou condições testadas (KHB ou F12), houve aumento na síntese de EROs.

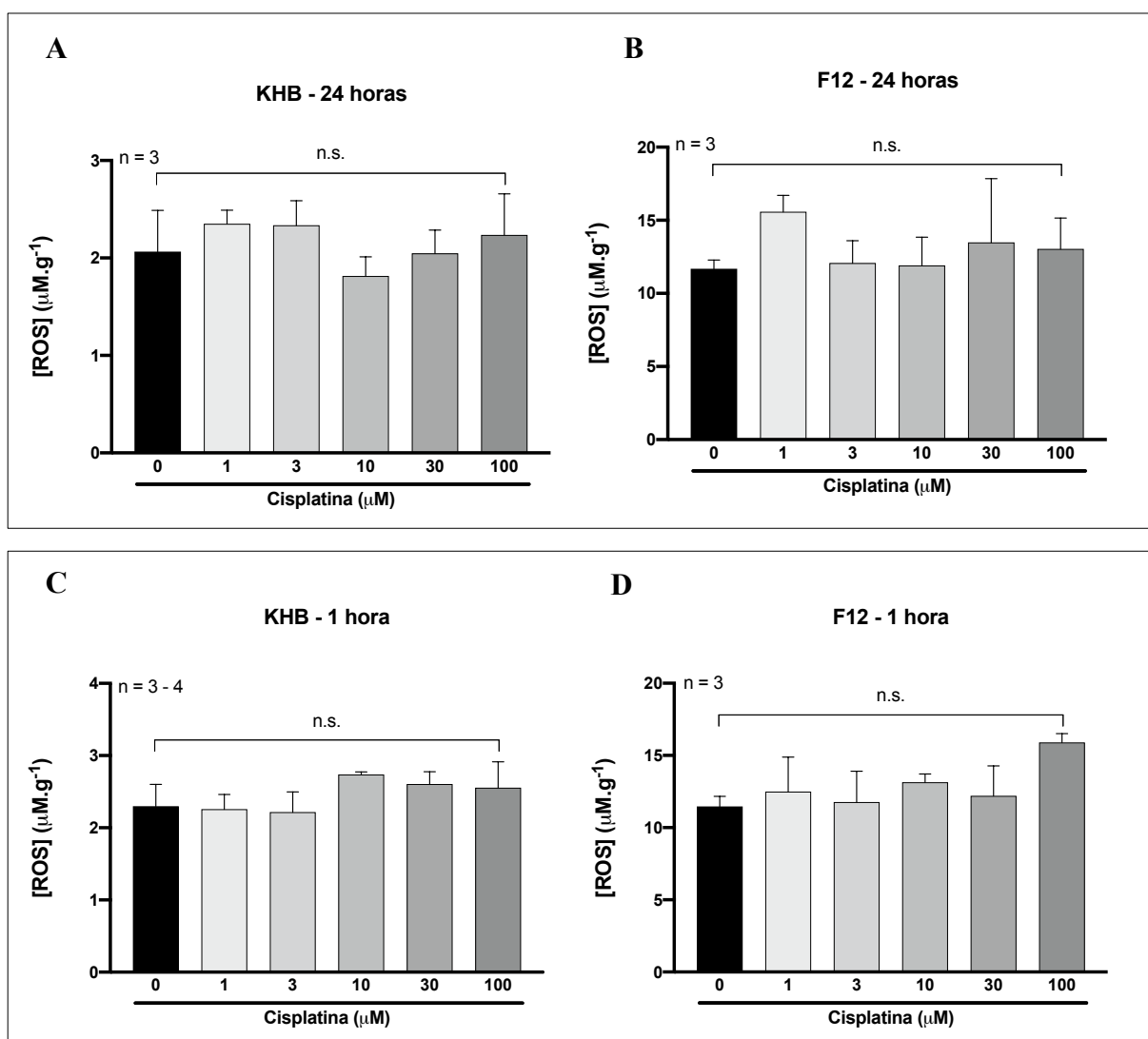


Figura 16. Concentração de EROs liberadas de cultura primária de células de GRDs após o tratamento com cisplatina e mensuradas por EPR. As colunas representam a concentração de EROs em $\mu\text{M.g}^{-1}$ nos grupos controle (barras pretas) e nos meios após o tratamento com cisplatina em diferentes tempos de exposição (barras cinzas em diferentes gradações). **A.** EROs presente no meio KHB após tratamento de 24 horas com cisplatina em diferentes concentrações, **B.** EROs presente no meio F12 após tratamento de 24 horas com cisplatina em diferentes concentrações, **C.** EROs presente em KHB após tratamento de 1 hora com cisplatina em diferentes concentrações e **D.** EROs presente em meio F12 após tratamento de 1 hora com cisplatina em diferentes concentrações. Os dados representam a média $\pm$ SEM. Os dados foram expressos como a média $\pm$ SEM, $n = 3-4$ em cada grupo.

Uma vez que não observamos aumento na quantidade de EROs nas condições testadas, decidimos fazer duas curvas tempo-resposta com concentrações fixas de cisplatina (30 μM e 100 μM). Estabelecemos também que a curva seria confeccionada com 6 pontos de tempos de tratamento, sendo 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos em meio KHB. Observamos que em nenhum dos tempos ou concentrações da cisplatina utilizadas, houve aumento da concentração de EROs liberada nas culturas de células de GRDs, como pode ser visto nas figuras 17 - A e B.

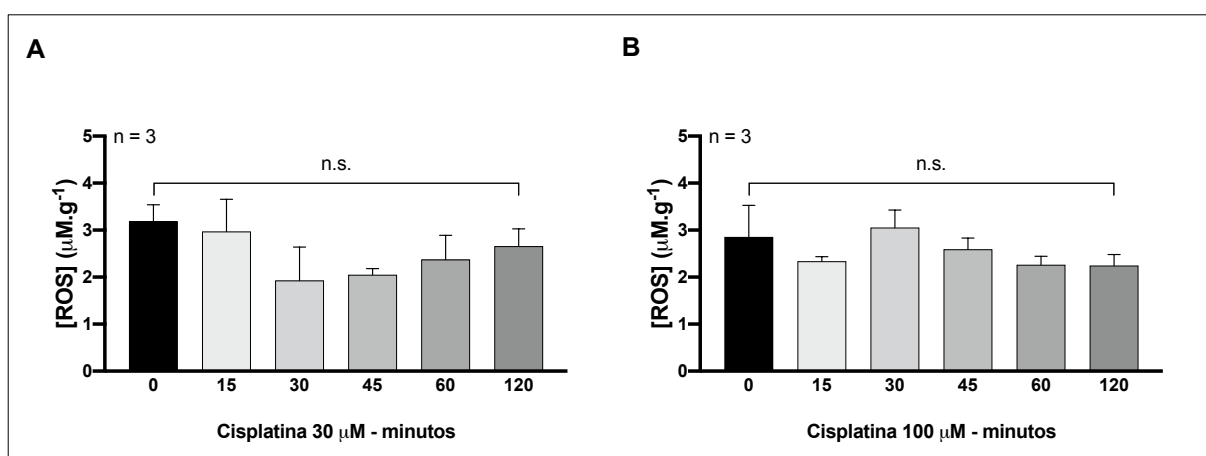


Figura 17. Concentração de EROs liberadas de cultura primária de células de GRDs após o tratamento com cisplatina em KHB e mensuradas por EPR. As colunas representam a concentração de EROs em $\mu\text{M.g}^{-1}$ nos grupos controle (barras pretas) e nos meios após o tratamento com cisplatina em diferentes tempos de exposição (barras cinzas em diferentes gradações). **A.** EROs liberadas em KHB após tratamento de 30 mM de cisplatina em diferentes tempos exposição **B.** EROs liberadas em KHB após tratamento com 100 μM de cisplatina em diferentes tempos de exposição. Os dados representam a média $\pm$ SEM, $n = 3$ em cada grupo.

Na presença de resultados negativos, foi necessário confirmar a ausência da indução do estresse oxidativo em decorrência do tratamento com a cisplatina. Assim, utilizamos outro modelo de análise de estresse oxidativo, utilizando células *neuron-like*. Dessa forma, tratamos células PC-12 diferenciadas com duas concentrações de cisplatina (30 e 100 μM) por 1 hora e avaliamos pela fluorescência do produto oxidado do 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (figura 18 – A), que é diretamente proporcional à formação de peróxido de hidrogênio (WANG E JOSEPH, 1999). Na figura 18 - B, podemos observar que ambas as concentrações de cisplatina induziram aumento da concentração de EROs, sendo que o aumento foi de 57,1% no tratamento com 30 μM e de 146,0% no tratamento com a maior concentração desse quimioterápico, 100 μM .

Uma vez que as concentrações de cisplatina estavam estabelecidas, verificamos se as concentrações do extrato de *E. dysenterica* induziam alguma resposta quanto à geração de EROs. Dessa forma, as células PC-12 diferenciadas foram tratadas por 24,5 horas com 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ desse extrato e observamos que nenhuma das concentrações testadas induziu qualquer resposta na geração de EROs, como pode ser observado na figura 18 – C.

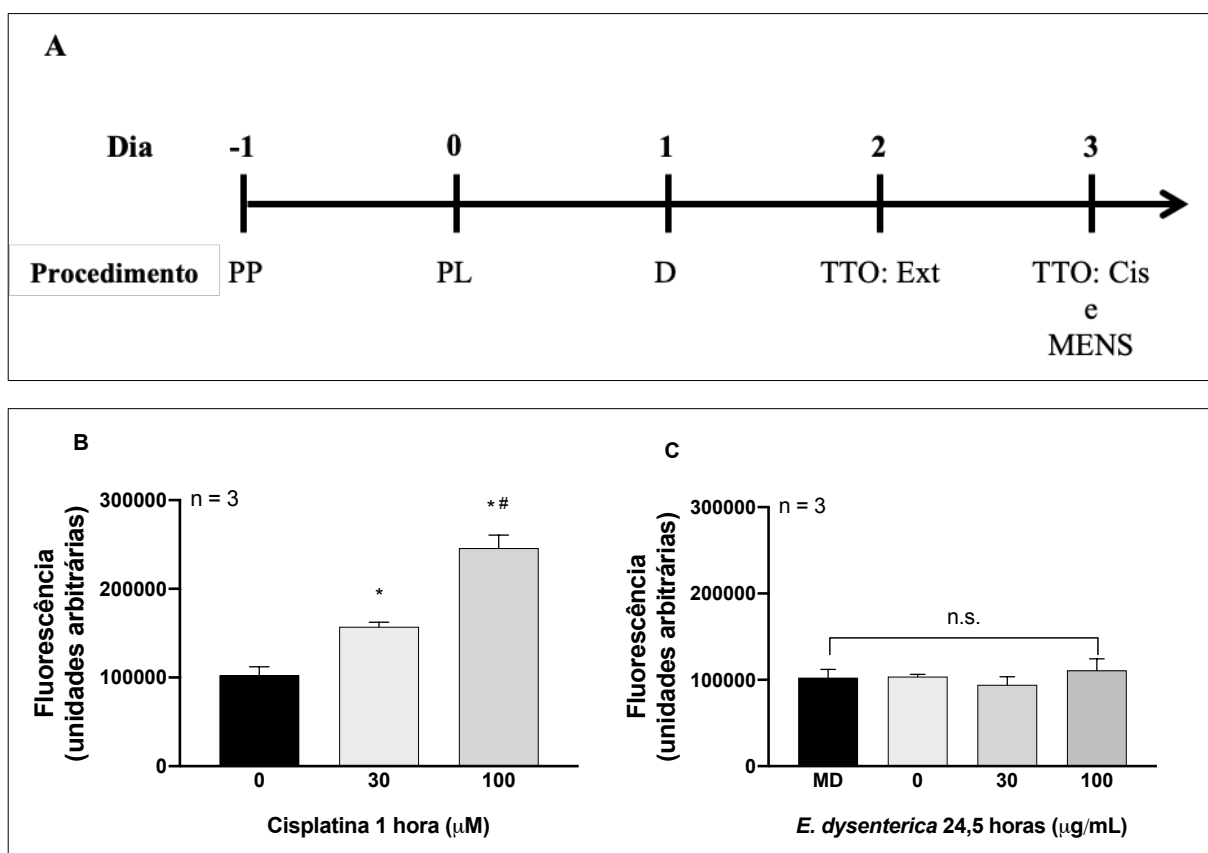


Figura 18. Fluorescência do DCF fluorescente em cultura de células PC-12 diferenciadas após o tratamento com cisplatina e extrato de *E. dysenterica*. As colunas representam a fluorescência emitida nos grupos controle (barras pretas) e nos tratamentos (barras cinzas em diferentes gradações), quantificada por fluorimetria. **A.** Representação esquemática do desenho experimental para os experimentos de quantificação de EROS por fluorescência. PP: preparo da placa de cultura, PL: plaqueamento das células PC-12 em meio RPMI completo, D: troca do meio de cultura para o meio de diferenciação, TTO – Ext: pré-tratamento com o extrato de *E. dysenterica*, TTO – Cis e MENS: tratamento com cisplatina + extrato de *E. dysenterica* e mensuração da fluorescência. **B.** Fluorescência emitida após culturas de células PC-12 diferenciadas tratadas com 30 ou 100 μM de cisplatina por 1 hora. **C.** Fluorescência emitida após culturas de células PC-12 diferenciadas tratadas com 0, 30 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *E. dysenterica* por 24,5 horas. MD: meio de diferenciação. Os dados representam a média $\pm$ SEM, $n = 3$ em cada grupo, * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs cisplatina 30 μM ; n.s.: não significativo.

O próximo passo foi verificar o potencial efeito neuroprotetor do extrato de *E. dysenterica* em relação à indução de síntese de EROs em decorrência do tratamento com cisplatina. Para isso, as culturas de células PC-12 diferenciadas foram pré-tratadas com 30 µg/mL do extrato por 23,5 horas e, posteriormente, foi adicionado ao meio de cultura 30 ou 100 µM de cisplatina por 1 hora, totalizando 24,5 horas de tratamento. Como pode ser visualizado na figura 19 - A, a presença do extrato reduziu o efeito da cisplatina em 41,3%, retornando os níveis igual ao controle. O mesmo efeito ocorre quando o estímulo foi uma concentração maior de cisplatina, 100 µM, onde o extrato reduziu essa resposta em 62,6%, perfazendo também uma resposta semelhante àquela observada no controle. Quando as células foram pré-tratadas com 100 µg/mL do extrato, a resposta do tratamento com 30 µM de cisplatina é reduzida em 26,3% e ao tratamento com 100 µM de cisplatina é reduzida em 47,4%, também reduzindo à níveis estatisticamente iguais ao do controle em ambos os casos (figura 19 – B)

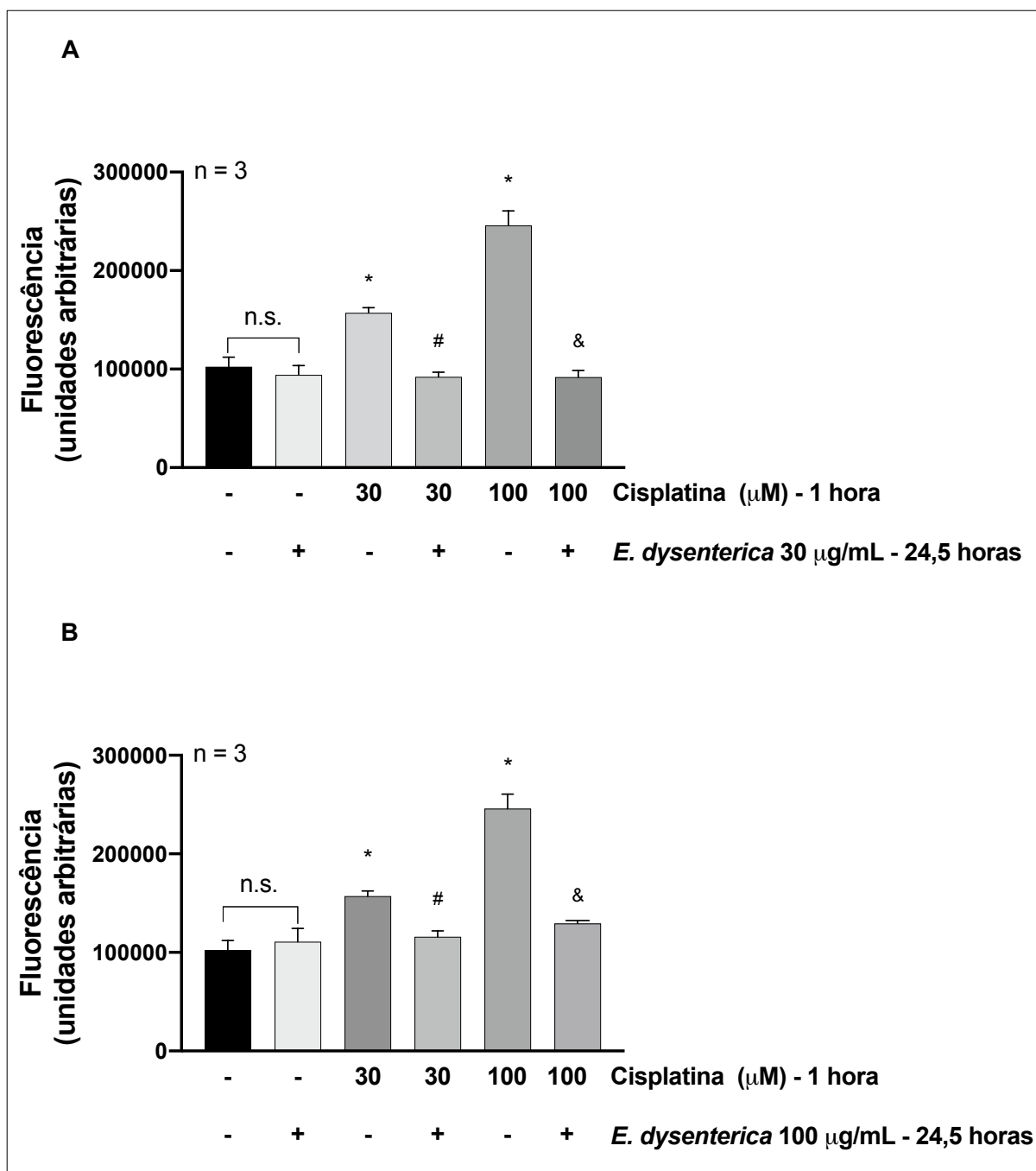


Figura 19. Fluorescência do DCF fluorescente em cultura de células PC-12 diferenciadas após o cotratamento com cisplatina e extrato de *E. dysenterica*. As colunas representam a fluorescência emitida nos grupos controle (barras pretas) e nos tratamentos (barras cinzas em diferentes gradações). A fluorescência emitida após os tratamentos foi quantificada por fluorimetria. **A.** Fluorescência emitida após culturas de células PC-12 diferenciadas previamente tratadas com 30 μ g/mL do extrato de *E. dysenterica* por 23,5 horas e posteriormente co-tratadas com 30 ou 100 μ M de cisplatina por 1 hora. **B.** Fluorescência emitida após culturas de células PC-12 diferenciadas previamente tratadas com 100 μ g/mL do extrato de *E. dysenterica* por 23,5 horas e posteriormente co-tratadas com 30 ou 100 μ M de cisplatina por 1 hora. Os dados representam a média $\pm$ SEM, n = 3 em cada grupo, *p < 0,05 vs controle, #p < 0,05 vs 30 μ M de cisplatina, &p < 0,05 vs 100 μ M de cisplatina.

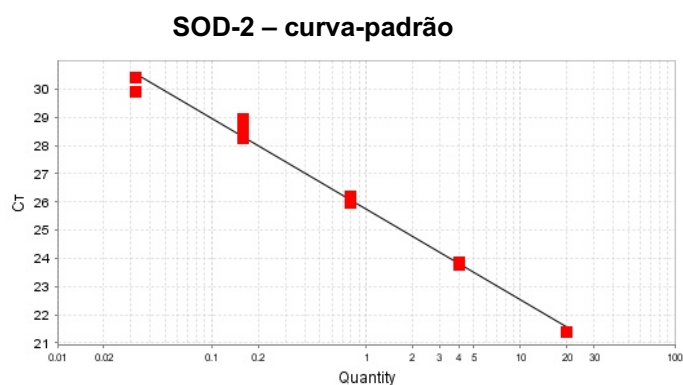
4.8. VALIDAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA RT-PCRq EM TEMPO REAL

No intuito de investigar mecanisticamente a neuroproteção mediada pelo extrato de *E. dysenterica* na neurotoxicidade induzida pela cisplatina acerca do estresse oxidativo, investigamos a expressão de duas proteínas chaves no processo de combate ao estresse oxidativo, a SOD-2 e o NRF2. Assim, primeiramente verificamos a especificidade e a eficiência dos pares de *primers* para os genes SOD-2 e NRF2 utilizados neste estudo, e então foram realizadas uma curva amplificação pela RT-PCRq e uma curva de *melting*. A validação do par de *primer* do gene da β -actina foi previamente realizada pelo nosso grupo em trabalho anterior (SOUZA, 2019). Conforme pode-se observar nas curvas de *melting*, todos os *primers* utilizados apresentaram especificidade para o gene de interesse e apresentaram apenas um pico na curva de dissociação, mostrando assim que não houve amplificação de outros produtos e nem formação de dímeros (figura 20 – B e D). Os gráficos das curvas-padrão podem ser observados na figura 19 – A e C. Além disso, todos os pares de *primers* apresentaram eficiências equivalentes e aproximadamente de 100%, bem como inclinação e r^2 compatíveis com os valores de referência (quadro 2).

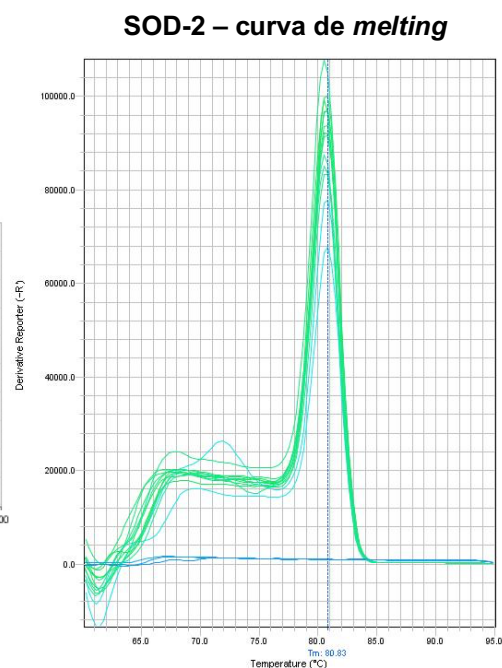
Quadro 2 – Eficiência relativa, inclinação das curvas-padrão e r^2 dos pares de *primers*

Gene	Eficiência (100% $\pm$ 10)	Inclinação (-3,32 $\pm$ 0,2)	r^2 (>0,990)
SOD-2	104,847	-3,21	0,991
NRF2	108,561	-3,13	0,991

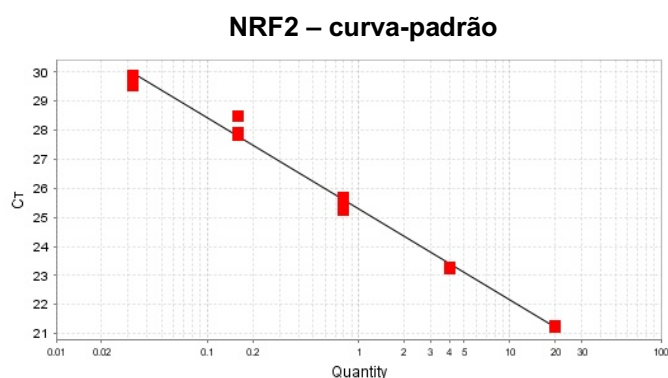
A)



B)



C)



D)

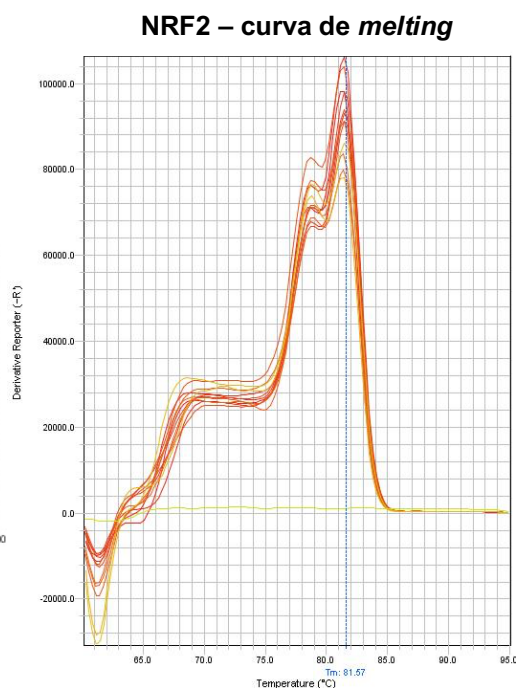


Figura 20. Especificidade e eficiência dos pares de *primers* de SOD-2 e NRF2. As curvas-padrão para cada par de *primer* foram realizadas com quantidade inicial de 20 ng de RNAm e essas foram diluídas de forma seriada 5 vezes com fator de diluição de 5. Os resultados obtidos foram analisados e representados como regressão linear e curva de *melting*. A expressão gênica foi determinada por RT-PCRq em tempo real. Regressão linear dos pares de *primers* dos genes para (A) SOD-2 e (C) NRF2. Curvas de *melting* dos *primers* dos genes para (B) SOD-2 e (D) NRF2.

4.9. A CISPLATINA AUMENTA A EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDATIVOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs

Em prosseguimento com a nossa investigação dos mecanismos pelos quais a cisplatina induz estresse oxidativo, quantificamos a expressão gênica de SOD-2 e Nrf2, após validarmos os pares de *primers*. Primeiramente, fizemos uma curva de concentração-efeito da cisplatina, onde as culturas primárias de células de GRD foram tratadas no 6º dia de cultura com 10, 30 ou 100 μM desse antitumoral por 24 horas. Como pode ser observado na figura 21 – A, a expressão gênica de SOD-2 foi alterada apenas após tratamento com 30 μM de cisplatina por 24 horas, onde observa-se um aumento de 162,1% na expressão desse gene em comparação com o controle. A expressão gênica de NRF2 não foi alterada por nenhum dos tratamentos realizados comparado com o controle (figura 21 - B).

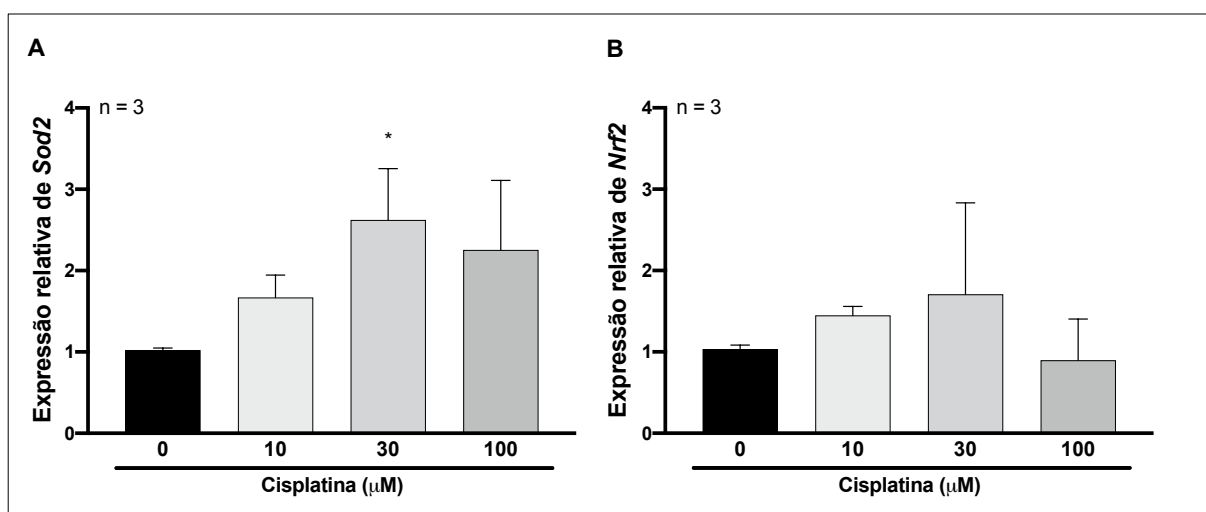


Figura 21. Expressão de RNAm de SOD-2 e NRF2 em culturas primárias de células de GRDs após o tratamento com cisplatina. Culturas primárias de GRDs foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de cisplatina no 6º dia de cultura. Em seguida, a expressão relativa de RNAm de SOD-2 e NRF2 foi determinada por RT-PCRq em tempo real e normalizada pelos valores de β -actina. **A.** Expressão gênica relativa de SOD-2 em cultura primária de células de GRD tratadas com 10, 30 ou 100 μM de cisplatina. **B.** Expressão gênica relativa de NRF2 em cultura primária de células de GRD tratadas com 10, 30 ou 100 μM de cisplatina. Para determinar diferenças entre os grupos, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido do pós teste de comparação múltipla de Dunn. Os dados foram expressos como a mediana $\pm$ intervalo, $n = 3$ em cada grupo, * $p < 0,05$ vs controle.

Após verificar os efeitos da cisplatina, investigamos o efeito do extrato da *E. dysenterica* nos mesmos genes. Assim, no 6º dia de cultura, fizemos uma curva de concentração-efeito em culturas primárias de células de GRDs do extrato de *E. dysenterica* com 0,3, 3,0 e 30,0 µg/mL por 24,5 horas. Observamos que nenhuma das concentrações testadas do extrato alteraram a expressão gênica de SOD-2, diferentemente do que ocorreu na expressão gênica de NRF2, onde o extrato na concentração de 30 µg/mL reduziu a expressão em 65,6% em comparação com o controle (figura 22 – A e B). As demais concentrações do extrato de *E. dysenterica* não alteraram a expressão de RNAm desse gene.

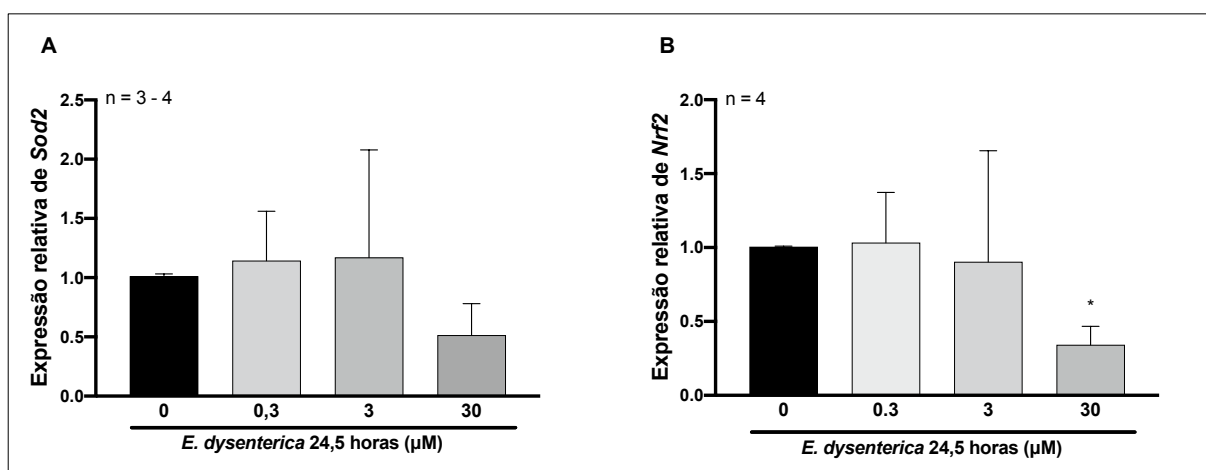
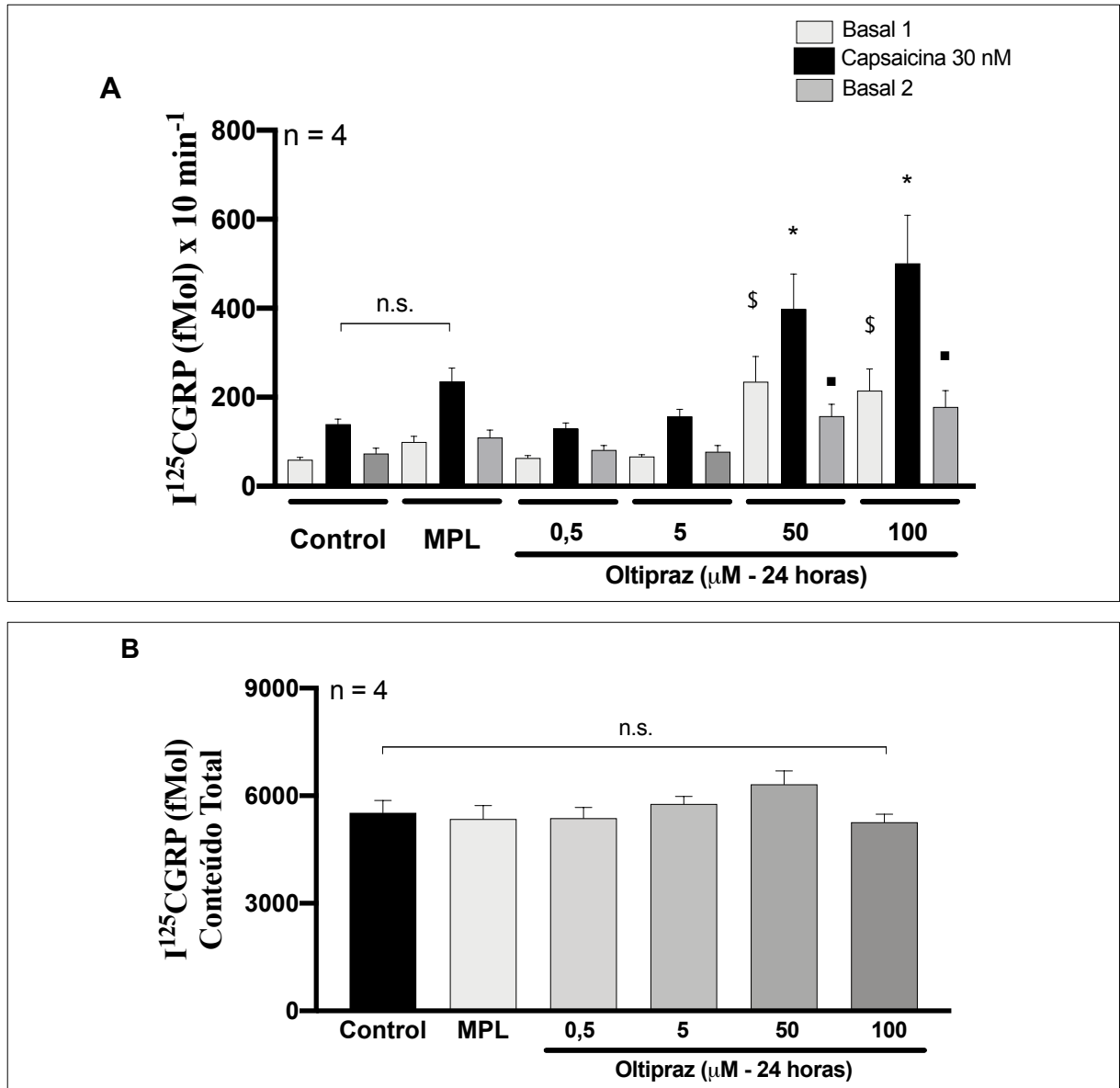


Figura 22. Expressão de RNAm de SOD-2 e NRF2 em culturas primárias de células de GRDs após o tratamento com extrato de *E. dysenterica*. Culturas primárias de células de GRDs foram tratadas por 24,5 horas com diferentes concentrações do extrato de *E. dysenterica* no 6º dia de cultura. Em seguida, a expressão relativa de RNAm de SOD-2 e NRF2 foi determinada por RT-PCRq em tempo real e normalizada pelos valores de β -actina. **A.** Expressão gênica relativa de SOD-2 em cultura primária de células de GRD tratadas com 0,3, 3 ou 30, µg/mL de *E. dysenterica*. **B.** Expressão gênica relativa de NRF2 em cultura primária de células de GRD tratadas com 0,3, 3 ou 30 µg/mL de *E. dysenterica*. Para determinar diferenças entre os grupos, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido do pós teste de comparação múltipla de Dunn. Os dados foram expressos como a mediana $\pm$ intervalo, n = 4 em cada grupo, *p < 0,05 vs controle.

4.10. ATIVADORES DA VIA NRF2/KEAP1/ARE INDUZEM AUMENTO DA RESPOSTA À CAPSAICINA SOBRE A LIBERAÇÃO DE CGRP EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DE GRDs

Uma das hipóteses do trabalho após verificar efeito sobre o estresse oxidativo é que tal proteção poderia ser mediada pela ativação da via Nrf2/Keap1/ARE. Assim, antes de avaliar esta resposta especificamente, investigamos se a ativação farmacológica desta via poderia alterar a resposta das culturas ao estímulo com capsaicina. Desta forma, fizemos curvas concentração-efeito com dois diferentes ativadores específicos da via: oltipraz e sulforafano. Assim, culturas primárias de células de GRDs foram tratadas com 0,5, 5, 50 e 100 μ M de oltipraz e 0,1, 1, 10 e 20 μ M de sulforafano por 24,5 horas, da mesma maneira que os tratamentos com os extratos. Essas concentrações foram baseadas em trabalhos que realizaram ensaios *in vitro* com células *neuron-like* (FURGE *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2017).

Nas figuras 23 - A e C observamos que as células foram responsivas ao estímulo com capsaicina e que o diluente do fármaco não alterou a liberação de CGRP (MPL 0,1%). Também é possível observar que o aumento da concentração dos ativadores induziu aumento da liberação de CGRP nessas células, em 3 momentos diferentes, no primeiro basal, quando estimuladas com capsaicina e no segundo basal. O oltipraz nas concentrações de 50 e 100 μ M induziu aumento da liberação de CGRP nos 3 momentos avaliados: no CGRP liberado basalmente aumentou em 291,9% (50 μ M) e 259,1%, (100 μ M); quando as células foram expostas à capsaicina, aumentou em 185,1% (50 μ M) e 257,9% (100 μ M); e basalmente após o estímulo, o tratamento com oltipraz induziu um aumento de 163,4% quando as células foram tratadas com 50 μ M e 257,3% quando o tratamento foi de 100 μ M. Os tratamentos com 10 e 20 μ M de sulforafano também aumentaram a liberação desse neuropeptídeo nos 3 momentos testados, basalmente essa droga aumentou 41,0% (tratamento com 10 μ M) e 63,4% (tratamento com 20 μ M); quando as células foram expostas à capsaicina, a liberação do CGRP aumentou em 110,9 (10 μ M) e 150,5% (20 μ M); e apenas a concentração mais alta induziu o aumento da liberação de CGRP basalmente após estímulo (96,0%). Quanto ao conteúdo de CGRP total, os ativadores não induziram qualquer alteração nesse parâmetro (figura 23 - B e D).



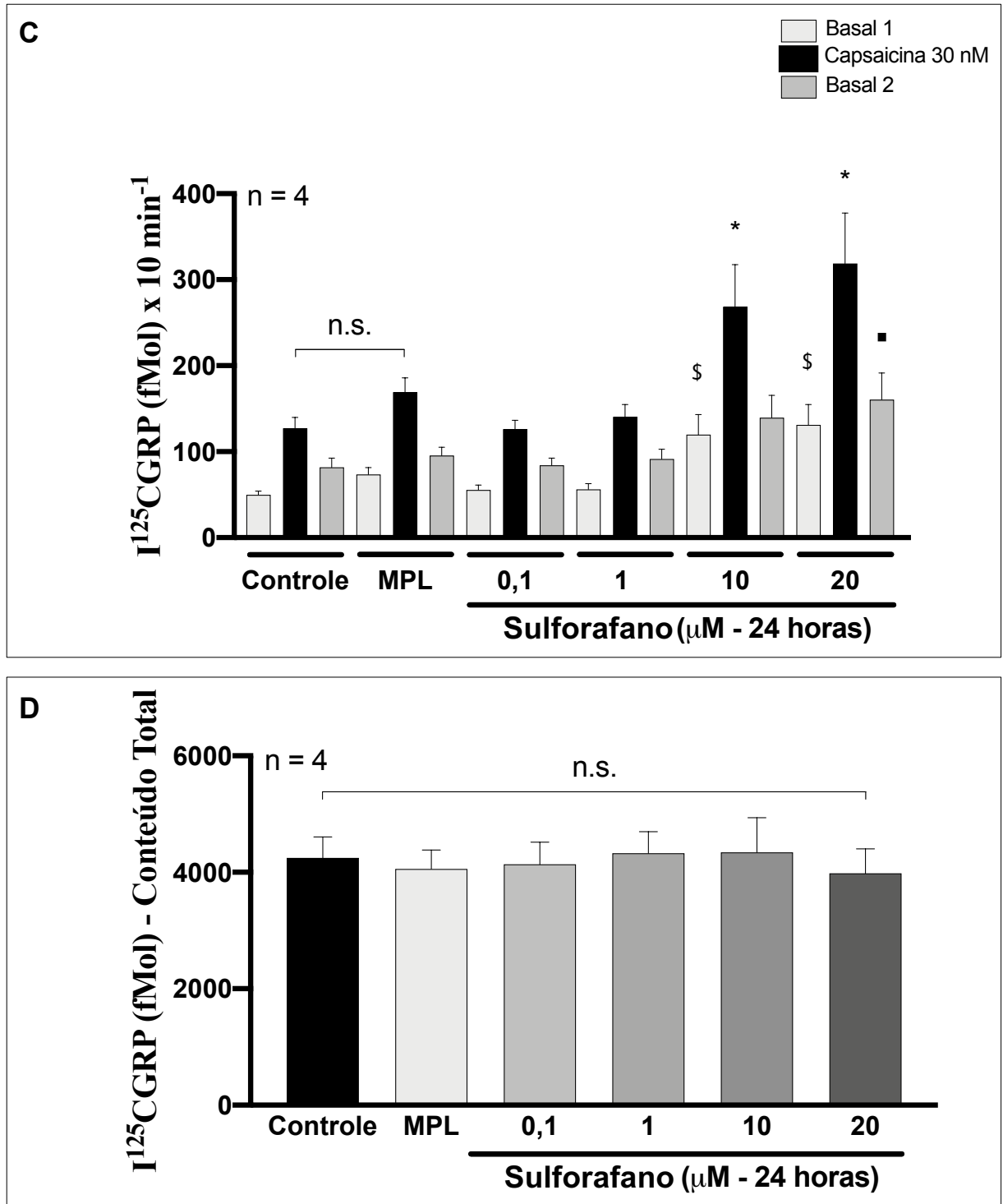


Figura 23. Os ativadores da via Nrf2/Keap1/ARE oltipraz e sulforafano aumentam a liberação de CGRP em cultura primária células de GRDs estimulada com capsaicina, sem alterar o seu conteúdo total. A. Culturas primárias de células de GRDs foram tratadas por 24,5 horas com 0,5, 5, 50 e 100 μM de oltipraz e o CGRP liberado pelos neurônios sensoriais foi quantificado por RIA. Cada coluna representa a média $\pm$ SEM dos valores de CGRP liberado em condições basais (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **B.** Conteúdo total de CGRP das culturas primárias de GRDs sem tratamento e tratadas com 0,5, 5, 50 e 100 μM de oltipraz por 24,5 horas. **C.** Culturas primárias de células de GRDs foram tratadas por 24,5 horas com 0,1, 1, 10 e 20 μM de sulforafano e o CGRP liberado pelos neurônios sensoriais foi quantificado por RIA. Cada coluna representa a média $\pm$ SEM dos valores de CGRP liberado em condições basais (colunas cinza-claros), estimulados (colunas pretas), basais pós-estímulo (colunas cinza-escuros). **D.**

Conteúdo total de CGRP das culturas primárias de GRDs sem tratamento e tratadas com 0,1, 1, 10 e 20 μ M de sulforafano por 24,5 horas. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM, n = 3 em cada grupo, $^{\$}p < 0,05$ vs controle – Basal 1, $^*p < 0,05$ vs controle - Capsaicina, $^{\blacksquare}p < 0,05$ vs controle – basal 2, n.s.: não significante. O grupo controle desses experimentos foi feito apenas com meio de cultura F12.

4.11. O EXTRATO DE *E. dysenterica* NÃO MODULA A REDUÇÃO DA NEURITOGÊNESE INDUZIDA PELA CISPLATINA EM CÉLULAS PC-12 DIFERENCIADAS

Outro método de mensuração da neurotoxicidade é através da quantificação do tamanho de neuritos, projeções citoplasmáticas presentes em neurônios e células *neuron-like* diferenciadas quando em cultura. Assim, células PC-12 diferenciadas foram pré-tratadas com 30 μ g/mL de extrato por 0,5 hora e, posteriormente, foi adicionado ao meio de cultura 30 μ M de cisplatina por 24 horas, totalizando 24,5 horas de tratamento, como pode ser observado nas figuras 24 A-C. Como pode ser observado na figura 25 - A, o tratamento com 30 μ M de cisplatina por 24 horas reduziu o comprimento de neuritos em 18,0%, que não foi revertido pelo pré-tratamento com o extrato de *E. dysenterica* (figura 25 B).

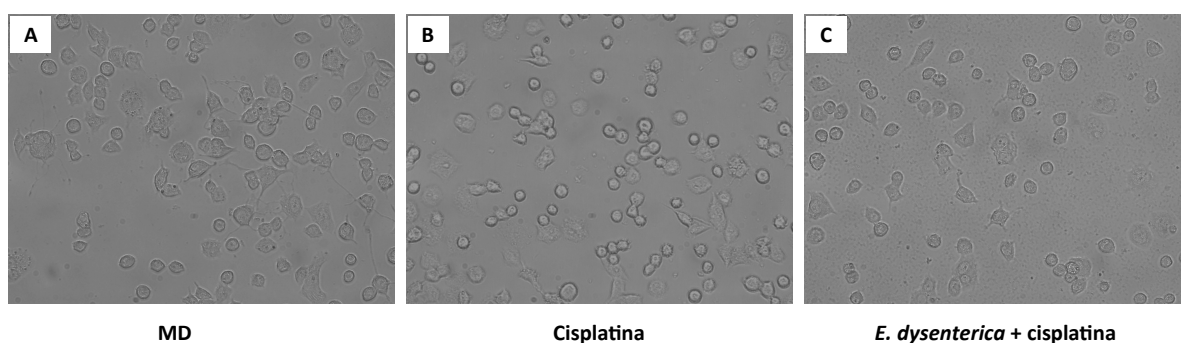


Figura 24. Fotomicrografia de fase em microscópio invertido das culturas de células PC-12 diferenciadas. As células aqui apresentadas foram mantidas a 5% de CO₂ e 37°C. **A.** Cultura de células PC-12 diferenciadas por 24 horas. **B.** Cultura de células PC-12 diferenciadas por 24 horas e tratadas com 30 μ M cisplatina por 24 horas. **C.** Cultura de células PC-12 diferenciadas por 24 horas pré-tratadas com 30 μ g/mL de extrato por 0,5 hora e, posteriormente, com 30 μ M de cisplatina por 24 horas. Magnificação de 400 vezes. Imagens representativas de cada tratamento realizado. Fotos feitas pelo autor.

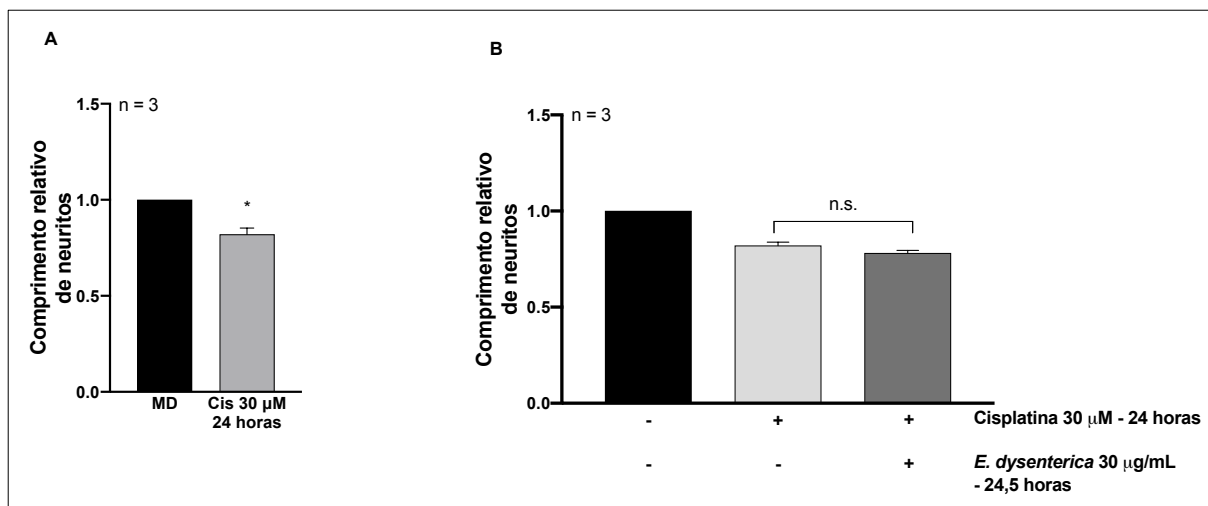


Figura 25. Quantificação de neuritos de células PC-12 diferenciadas após o tratamento com cisplatina e extrato de *E. dysenterica*. As colunas representam o comprimento relativo ao controle de neuritos de células PC-12 diferenciadas. **A.** Comprimento relativo de neuritos após culturas de células PC-12 diferenciadas tratadas com 30 μ M de cisplatina por 24 horas. **B.** Comprimento relativo de neuritos após culturas de células PC-12 diferenciadas pré-tratadas com 30 μ g/mL de extrato de *E. dysenterica* por 0,5 hora e posteriormente cotratadas com 30 μ M de cisplatina por 24 horas. MD: meio de diferenciação. Os dados representam a média $\pm$ SEM, n = 3 em cada grupo, *p < 0,05 vs MD; n.s.: não significativo.

5. DISCUSSÃO

A neurotoxicidade é um efeito adverso comum que ocorre durante o tratamento com diversas classes de antitumorais. Essa por sua vez, pode ser classificada segundo o seu local de manifestação, sendo chamada de neuropatia periférica induzida por quimioterápicos quando afeta o sistema nervoso periférico, foco desse estudo.

Estudar estratégias farmacológicas contra este efeito adverso é importante devido à limitação de tratamento, seja ele preventivo ou mesmo curativo. Atualmente, o tratamento disponível é apenas paliativo, realizado por intermédio do uso da duloxetine, um antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina e norepinefrina, que é a primeira linha de tratamento, com eficácia moderada (LOPRINZI, *et al.*, 2020). É oportuno salientar que esse efeito adverso é um fator limitante para o tratamento quimioterápico, uma vez que a severidade dos sintomas é dose-dependente, e em consequência disso, o tratamento pode ser descontinuado ou subótimo.

Neste trabalho avaliamos se o extrato de *E. dysenterica*, uma planta do Cerrado brasileiro, possui efeito neuroprotetor na neuropatia periférica. Assim, realizamos ensaios farmacológicos *in vitro* em culturas primárias de células do gânglio da raiz dorsal de ratos naïves e células PC-12 diferenciadas em células *neuron-like*. Estudos que considerem utilizar células previamente aos estudos *in vivo*, quando aplicável, obedecem a política dos 3Rs: o princípio da redução (*reduction*), do refinamento (*refinement*) e da substituição (*replacement*) instituída pelo CONCEA em referência ao preconizado pela *National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research* (NC3R's, 2019). Todos os ensaios realizados objetivaram minimizar o sofrimento do animal, bem como a quantidade deles utilizada.

Também é importante destacar a importância do bioma Cerrado para a sociedade brasileira. Esse bioma abrange diversos estados do Brasil e possui uma flora e fauna bastante diversa e complexa. Explorar conscientemente as potencialidades em diversas áreas que o Cerrado oferece é extremamente importante. Quanto à terapêutica, há a oportunidade de descoberta de novas fontes e novas moléculas que são farmacologicamente ativas. Tais moléculas podem ser isoladas, caracterizadas e sintetizadas em laboratório, o que pode resultar no desenvolvimento de novos medicamentos, culminando enfim em ganhos econômicos locais, estaduais

e nacionais. Um exemplo de um produto farmacêutico pesquisado e totalmente desenvolvido no Brasil é o anti-inflamatório Acheflan®, cujo princípio ativo é o óleo essencial da *Cordia verbenacea* DC, planta popularmente conhecida como erva-baleeira, endêmica da Mata Atlântica (CALIXTO, 2019; PASSOS, *et. al.*, 2007).

O extrato de *E. dysenterica*, dentre outras atividades, possui atividade antioxidante *in vitro* (CLEMENTINO *et al.*, 2016; GASCA *et al.*, 2017). Utilizar compostos antioxidantes pode ser uma estratégia interessante na NPIQ, já que uma das alterações desencadeadas pelos quimioterápicos nos GRDs é o desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e a resposta do organismo frente a esse insulto, o estresse oxidativo (BUTTURINI *et al.*, 2013). Nossa primeira avaliação foi determinar a toxicidade do extrato aquoso da *E. dysenterica* nas culturas primárias de células de GRDs. Essas culturas primárias são um dos modelos *in vitro* de NIPQ mais utilizados, pois, além de serem uma excelente ferramenta para o estudo de neuroproteção, são fundamentais para o entendimento das modificações que ocorrem na NPIQ (ZHU *et al.*, 2016; MELLI e HÖKE, 2009). É através desse entendimento que o desenvolvimento de estratégias para a sua prevenção, redução ou cura pode ser possível.

Assim, nós avaliamos o efeito do extrato de *E. dysenterica* na viabilidade celular. As concentrações utilizadas foram baseadas no trabalho de Gasca e colaboradores (2017), em que células SH-SY5Y foram tratadas por 24 horas com até 500 µg/mL do extrato e os autores observaram que a primeira concentração que reduziu a viabilidade celular em mais de 30% foi de 30 µg/mL. Assim, decidimos realizar uma curva de concentração-efeito em que os valores compreendiam aqueles 10 vezes superior e 10 vezes inferior. Demonstramos que mesmo na maior concentração avaliada, o extrato de *E. dysenterica* não induziu redução da viabilidade das células das culturas primárias de GRDs maior do que 30%. De acordo com a ISO 10993-5 *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* de 2009, pode-se considerar um composto citotóxico quando esse reduz a viabilidade celular em no mínimo 30%. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva e colaboradores (2015), em que fibroblastos da linhagem L929 foram tratados com 261,25 µg/mL de óleo essencial de *E. dysenterica* e não houve redução da viabilidade celular. Ainda, os pesquisadores observaram que em macrófagos da linhagem celular RAW 264,7 essa concentração induziu uma redução da viabilidade celular superior a

30%. Dessa maneira, podemos inferir que diferentes tipos celulares possuem diferentes susceptibilidades quanto a viabilidade celular ao extrato de *E. dysenterica*. Além disso, cabe salientar que no estudo de Silva e colaboradores (2019), os tratamentos foram conduzidos com o óleo essencial das folhas da planta, diferentemente desse trabalho, em que utilizamos o extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica*. Embora o mesmo extrato tenha sido utilizado no estudo de Gasca e colaboradores (2017), as células estudadas por esses pesquisadores eram células oriundas de tumor cerebral humano. É válido também ressaltar que ainda não há estudos publicados com o uso deste extrato em cultura primária de células de GRDs.

Também avaliamos o efeito da cisplatina sobre a viabilidade de células da cultura primária de GRDs, em que observamos que as concentrações testadas desse antitumoral não induziam morte celular maior do que àquela estipulada como citotóxica. Tais dados estão em concordância com os já descritos na literatura (GUO *et al.*, 2016; JIANG, *et al.*, 2008), indicando que as alterações observadas são em decorrência de mecanismos intrínsecos da cisplatina e não de consequências da morte celular.

Ressaltamos ainda que nos estudos de neurotoxicidade, uma substância classificada como neurotóxica não necessariamente é aquela que induz morte celular de células do SN. Neste trabalho, em consonância com dados da literatura, demonstramos toxicidade da cisplatina por diversos mecanismos, inclusive por alteração funcional.

Uma vez demonstrado a plausibilidade do uso do extrato de *E. dysenterica* como agente neuroprotetor, o próximo passo foi verificar se tal extrato possuía algum efeito modulatório na toxicidade tumoral da cisplatina. Essa é uma característica crucial para um agente com potencial atividade neuroprotetora contra a NPIQ, pois um requisito é que a neuroproteção desse agente deva ocorrer sem interferência negativa na toxicidade tumoral do quimioterápico (JAGGI e SINGH, 2012; PARK, *et al.*, 2008). Dessa forma, realizamos essa avaliação em cultura primária de células de A549, que são oriundas de carcinoma epitelial de pulmão, câncer prevalente cujo tratamento farmacológico é realizado com cisplatina. Verificamos que não há qualquer modulação do efeito citotóxico da cisplatina nessas células advinda do extrato de *E. dysenterica*, o que nos permitiu dar prosseguimento aos demais ensaios.

Até o nosso conhecimento, existem duas pesquisas que avaliaram a atividade antitumoral em que a *E. dysenterica* estivesse envolvida. Vitek e colaboradores (2016)

avaliaram componentes isolados do extrato metanólico das folhas da *E. dysenterica*, e observaram que havia atividade antileucêmica do composto quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid em modelo celular de leucemia mieloide aguda (células Kasumi-1) e leucemia linfoblástica aguda (células CCRF-CEM - VITEK, *et al.*, 2016). Eles observaram que o IC₅₀ desse composto após 24 horas de tratamento é de 36,7 μ M (22,6 μ g/mL) na cultura de células Kasumi-1 e 40,3 μ M (24,9 μ g/mL) em culturas de células CCRF-CEM. Cabe ressaltar que os autores verificaram a ação de um componente isolado em concentrações semelhantes à totalidade do extrato aqui usado, o que poderia caracterizar uma concentração muito superior àquela encontrada no nosso extrato, já que sua composição é o somatório de quantidades menores dos seus diversos componentes. No segundo estudo, Gasca e colaboradores (2017) avaliaram a citotoxicidade do extrato das folhas de *E. dysenterica* em uma linhagem celular de neuroblastoma humano (células SH-SY5Y) e demonstraram que o tratamento por 24 horas com concentrações a partir de 15,6 μ g/mL do extrato reduziu a viabilidade celular, porém, os autores não explicitaram a partir de qual concentração a redução da viabilidade é superior a 30%. Tais dados contrastam com os nossos achados, o que pode ser atribuído principalmente ao método de avaliação da viabilidade celular e ao tipo celular. Diferentemente dos autores que utilizaram a atividade do sistema da succinato-tetrazólio redutase (enzima envolvida no metabolismo mitocondrial) para avaliar a viabilidade celular, nós optamos pelo método de exclusão por azul de tripano em decorrência dos efeitos da cisplatina e também do potencial efeito do extrato na mitocôndria (CANTA, POZZI E CAROZZI, 2015; LEO *et al.*, 2020). Métodos que se baseiam no metabolismo celular podem ter resultados falso-positivos devido ao tratamento com fármacos que alteram enzimas importante na produção de energia celular. Assim, os dados supracitados corroboram os resultados anteriores quanto à sensibilidade distinta ao extrato de diferentes tipos celulares.

Uma vez que observamos a ausência de toxicidade em relação à morte celular do extrato da *E. dysenterica* nos experimentos de viabilidade, decidimos utilizar a concentração de 30 μ g/mL para os próximos experimentos. Essa concentração foi escolhida por ser intermediária, além dessa concentração ser semelhante àquela que possui atividade farmacológica em cultura celular de SH-SY5Y, atividade inibitória de colinesterase com 31,2 μ g/mL (GASCA *et al.*, 2017). Já Souza e colaboradores (2011)

mostraram também atividade farmacológica do extrato aquoso de *E. dysenterica* ao inibir duas enzimas *in vitro*, α -amilase e α -glucosidase, em que os valores de IC₅₀ foram de 14,93 e 0,46 μ g/mL, respectivamente.

O próximo passo foi determinar a concentração de cisplatina a ser utilizada como agente neurotóxico. Nesse trabalho, avaliamos primeiramente a neurotoxicidade e a sua possível prevenção por intermédio da avaliação da quantidade de CGRP liberado e total. Verificar a liberação desse neuropeptídeo é uma ferramenta para avaliar funcionalmente os neurônios, pois dessa maneira é possível investigar a capacidade de sensibilização dos nociceptores. Pode-se definir a sensibilização periférica como uma plasticidade neuronal evocada por algum estímulo, em que os nociceptores reduzem o seu limiar de excitação, aumentando, portanto, sua responsividade (WOLF E MA, 2007). No contexto da NPIQ, esse fenômeno é bastante importante, visto que os sintomas sensoriais geralmente são sintomas de hipersensibilidade aos estímulos externos, tais como a mecânica e térmica (COLVIN, 2019; SHIM, *et al.*, 2019). Além disso, o CGRP é um dos neuropeptídeos liberados durante a transmissão do sinal nociceptivo (GOLD E GEBHART, 2010).

Embora os efeitos da cisplatina nas culturas de células de GDRs já estejam bem descritos na literatura, decidimos repetir os experimentos de liberação de CGRP devido a mudanças no protocolo de cultura dessas células. No protocolo utilizado no nosso trabalho, dois inibidores mitóticos anteriormente utilizados para controle da proliferação das células não-neuronais foram retirados do meio de cultura (FDU e Uridina). Verificamos na literatura que estes inibidores poderiam causar dano no DNA (CAO *et al.*, 2016; KUMARI *et al.*, 2009), o que poderia interferir diretamente nos resultados dos experimentos conduzidos no laboratório, como por exemplo, na avaliação de dano ao DNA.

Assim, verificamos que o tratamento por 24 horas com 30 μ M de cisplatina induz aumento da liberação de CGRP juntamente com a redução do seu conteúdo total. Nossas observações estão em discordância com os dados previamente publicados por Jiang e colaboradores (2008), onde esses pesquisadores observaram que o tratamento das culturas primárias de células de GRDs com 10 e 30 μ M de cisplatina já foi capaz de reduzir a quantidade de CGRP liberado sem alterar o seu conteúdo total, indicando sensibilização neuronal. Essa redução também foi observada por Georgiadis e colaboradores (2016), em que a exposição de neurônios

sensoriais de cultura primária de células de GRDs a apenas 10 μ M de cisplatina por 24 horas reduziu os níveis de CGRP liberados. Tal diferença pode ser relacionada a ausência dos anti-mitóticos previamente citados, visto que foi a única variável entre os experimentos. É importante ressaltar que uma alternativa para essa redução da liberação do CGRP poderia ser uma menor quantidade disponível de TRPV1 na superfície celular. Entretanto, Yang e colaboradores (2018) verificaram que o mRNA desse receptor aumentava nas culturas primárias de células de GRDs de camundongos C57BL/6 quando esses eram tratados com oxaliplatina, indicado que essa redução do CGRP é em decorrência a ações diretas na sua síntese ou mudanças pós transcricionais. Reforçando essa hipótese, o conteúdo total do CGRP também foi reduzido pelo tratamento com cisplatina. A cisplatina aumenta a quantidade de cálcio intracelular, o que poderia explicar o aumento da quantidade de CGRP liberado pelos neurônios (KHASABOVA, *et al.*, 2019; LEO, *et al.*, 2020). É importante destacar que a concentração escolhida, induz alterações celulares nos neurônios periféricos sem, entretanto, alterar a viabilidade celular.

Observamos também que 100 μ M de cisplatina reduz tanto a quantidade de CGRP liberado quanto o seu conteúdo total. Não observamos diferença estatística na taxa de liberação de CGRP após estímulo com capsaicina nesse tratamento em relação ao controle. Ressaltamos que, embora a taxa de liberação seja a mesma, 100 μ M de cisplatina induz morte celular (dose letal 50: 80 μ M), sendo, portanto, uma concentração citotóxica (JIANG *et.al.*, 2008). Além disso, essa concentração poderia induzir uma resposta neurotóxica muito intensa, que qualquer potencial efeito protetor do extrato poderia não ser observado.

Uma vez que as concentrações da cisplatina e do extrato de *E. dysenterica* foram definidas, investigamos qual o efeito do extrato sobre a função neuronal. Assim, tratamos as culturas de células GRDs com diferentes concentrações do extrato e quantificamos o CGRP liberado. Primeiro avaliamos a função neuronal de neurônios TRPV1-positivos. Isso foi possível por intermédio do uso de capsaicina, agonista desse receptor. Observamos que nas condições descritas, o extrato reduziu a liberação CGRP, sem, entretanto, alterar o conteúdo total desse neuropeptídeo, reduzindo assim a sensibilização neuronal.

Decidimos então verificar se a atividade do extrato era específica a uma subpopulação neuronal ou se era uma resposta neuronal generalizada, e para isso,

expusemos as células a outro agente despolarizante, o KCl, que induz uma resposta pan-neuronal, isto é, indistintamente todos os neurônios são despolarizados e liberam CGRP. Observamos que apenas a maior concentração testada do extrato (100 µg/mL) foi capaz reduzir a quantidade de CGRP nas culturas expostas a 50 mM de KCl, sem alterar a quantidade no conteúdo total desse neuropeptídeo. Uma possível explicação para essa redução observada após a exposição aos agentes despolarizantes, capsaicina e KCl, é a presença da molécula catequina no extrato (GASCA *et al.*, 2017). Essa molécula modula a quantidade de cálcio citosólico, que foi aumentado pelo tratamento com 10 µM da proteína β-amiloide em modelo de Doença de Alzheimer *in vitro* e culminou na redução da liberação de glutamato em cultura primária de neurônios corticais de ratos (BAN *et al.*, 2006).

Visto isso, a nossa hipótese foi que o tratamento com extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* poderia proteger as células da neurotoxicidade induzida pela cisplatina *in vitro*. Neuroproteção com o uso de plantas contra quimioterápicos já foi demonstrado anteriormente. Vieira e colaboradores (2012) demonstraram efeito genoprotetor e citoprotetor desta planta do Cerrado em modelo animal de toxicidade induzida por ciclofosfamida, fármaco antitumoral que forma adutos com DNA. Reforçando essa hipótese, Azevedo e colaboradores (2018) demonstraram que a quercetina e rutina, dois produtos do metabolismo secundário de plantas, eram neuroprotetores contra a dor neuropática induzida pela oxaliplatina.

Depois de verificar que o tempo é um fator determinante para o pré-tratamento com extrato, avaliamos se esse tratamento prévio poderia prevenir os efeitos causados pela cisplatina, isto é, se o extrato reduziria a sensibilização neuronal causada pela neurotoxicidade da cisplatina. Assim verificamos que o extrato teve atividade neuroprotetora tanto em neurônios TRPV1-positivos, quanto de forma geral, visto que ele preveniu a sensibilização neuronal dos neurônios estimulados com capsaicina e estimulados com KCl. Essa foi a primeira descrição do efeito neuroprotetor do extrato de *E. dysenterica* em modelo de neuropatia periférica induzida por quimioterápicos. Interessantemente, o efeito neuroprotetor desse extrato já foi descrito anteriormente em modelo de neurodegeneração induzida por alumínio (THOMAZ *et al.*, 2018). Esses pesquisadores avaliaram o potencial efeito neuroprotetor do extrato hidroalcoólico de *E. dysenterica* tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e verificaram atividade neuroprotetora via redução do estresse oxidativo causado pelo alumínio no cérebro. Os autores demonstraram que o extrato recuperou níveis

alterados pelo alumínio no córtex cerebral e hipocampo, das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, da atividade de SOD, da atividade de catalase e da atividade da acetilcolinesterase, todos relacionados ao estresse oxidativo. Nossa hipótese é que a neuroproteção observada nesse trabalho também pode ser mediada pela redução de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Além disso, um resultado semelhante de redução da responsividade neuronal aumentada por um agente tóxico devido ao tratamento com quercetina foi observado em modelo *in vitro* da Doença de Alzheimer (BAN *et al.*, 2006). No estudo, culturas primárias de neurônios corticais (origem: ratos da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem Sprague-Dawley) foram tratadas com a proteína β -amilóide e quercetina, e os pesquisadores observaram que a quantidade de cálcio citosólico aumentada pela β -amilóide era reduzida na presença de 10 μ M de quercetina. Os autores mostraram que a quercetina também modula outras respostas neuronais, como a liberação de glutamato, já que o tratamento com 10 μ M de quercetina bloqueou o aumento da liberação de glutamato induzida pela exposição à proteína β -amilóide.

Além dos dados apresentados, Clementino e colaboradores (2016) observaram atividade antioxidante do extrato das folhas de *E. dysenterica* determinada por voltametria e espectroscopia *in vitro*. Reforçando esses dados, Gasca e colaboradores (2017) verificaram que esse extrato possui duas moléculas, que dentre outras propriedades, possuem atividade antioxidante, a quercetina e a catequina (KASHIMA, 1999). Ressaltamos que nesse trabalho usamos o extrato da *E. dysenterica* em sua totalidade, isto é, não foi realizado tratamentos com seus componentes isolados. Assim, a interpretação dos dados é limitada quanto à responsabilidade dos efeitos observados, uma vez que esse pode ocorrer em decorrência da atuação de diversas moléculas em conjunto.

É importante destacar que os ensaios de liberação de CGRP são distintos dos ensaios de avaliação da quantidade total desse neuropeptídeo. Enquanto o ensaio de liberação de CGRP é um indicador de excitabilidade neuronal, o outro avalia a síntese proteica. As alterações desse valor significam modulações da transcrição gênica. Nesse trabalho, observamos que o extrato de *E. dysenterica* não alterou a quantidade de CGRP reduzida pela cisplatina, reforçando que o extrato possui atividade somente na excitabilidade neuronal, que foi alterada pelo tratamento destas células com cisplatina, indicando atividade protetora da funcionalidade neuronal.

Ainda caracterizando a toxicidade da cisplatina e buscando entender como a sensibilização neuronal causada pela cisplatina foi reduzida pelo extrato de *E. dysenterica*, suscitamos a possibilidade do envolvimento de mediadores inflamatórios, como citocinas, que podem estimular e sensibilizar neurônios diretamente (SCHÄFERS E SORKIN, 2008). Assim, buscamos entender como esse efeito poderia estar acontecendo no nosso modelo de NPIQ. Baseado na literatura, hipotetizamos que os extratos poderiam ser neuroprotetores por mecanismos de controle do estresse oxidativo e da inflamação induzidos pela cisplatina. O envolvimento dessas proteínas já foi avaliado na NPIQ, por exemplo, em um estudo não-clínico foi observado que o tratamento com dose única de cisplatina (8 mg/Kg) aumentou a concentração de citocinas, como o TNF- α e IL-1 β em homeogenato de cérebro e soro dos animais tratados (ABDEL-WAHAB E MOUSSA, 2019).

Como os quimioterápicos também induzem uma resposta inflamatória (LEDEBOER, *et al.*, 2007; KUAI *et al.*, 2020), em um primeiro momento, investigamos o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias no nosso modelo de NPIQ. Observamos que a cisplatina aumentava a liberação de IL-1 β no nosso modelo, o que está em consonância com a literatura, em que a liberação de citocinas pró-inflamatórias já foi observada tanto *in vitro* (OLIVEIRA, *et al.*, 2022) quanto *in vivo* (ABDEL-WAHAB E MOUSSA, 2019; KUAI *et al.*, 2020). Dessa forma, podemos concluir que a neurotoxicidade da cisplatina envolve modulação da resposta inflamatória sistêmica e local, onde em última instância, altera a excitabilidade das células de GRDs, que pode ser reflexo dos sintomas observados na NPIQ.

Baseado na premissa de efeito anti-inflamatório de componentes do extrato, como a catequina (CHEN *et al.*, 2020; KALENDER *et al.*, 2012), o segundo passo dessa etapa foi observar o efeito do tratamento com o extrato de *E. dysenterica* na indução da liberação de IL-1 β . Essa etapa foi necessária pois caso observássemos efeito inflamatório do extrato de *E. dysenterica*, nossa hipótese de neuroproteção mediada pela inibição da liberação de citocinas se provaria errada. Nossos dados mostram que apenas a concentração de 3 μ M foi capaz de induzir liberação dessa citocina, sendo, portanto, uma resposta em “U” invertido. Existem situações que tal fenômeno acontece, como observado com sensibilização neuronal após o tratamento com diferentes concentrações de cisplatina. Pode ser que esse efeito também esteja

ocorrendo sobre a expressão de IL-1 β no nosso modelo de NPIQ, porém, não há dados na literatura que comprovem tal hipótese.

Salientamos que a cultura de GRDs é classificada como uma cultura mista, isto é, formada por vários tipos celulares, pois possui além de neurônios, células não-neuronais, que dentre outros tipos, destacam-se a glia e fibroblastos. Isso é importante na avaliação dos resultados obtidos, já que há uma intrínseca e complexa comunicação entre essas células e que elas podem ser determinantes para descoberta da fisiopatologia e farmacoterapia da NPIQ. Fisiologicamente, a interação entre as células presentes no GRD é importante para a manutenção neurofuncional, e já há descrito seu envolvimento com a nocicepção (WATKINS e MAIER, 2002; TSUDA *et al.*, 2005; MANNELLI *et al.*, 2014). Caso o aumento da resposta inflamatória observada seja relacionado às células não-neuronais, pode ser que o extrato da *E. dysenterica* tenha efeito indireto sobre os neurônios. Assim, para alcançar o efeito anti-inflamatório que compostos isolados possuem, seja necessária uma concentração do extrato muito superior àquela aqui utilizada.

Uma limitação desse trabalho é a ausência do tratamento com o extrato da *E. dysenterica* na presença da cisplatina. Infelizmente, não tivemos tempo hábil para realização de tais experimentos. Explorar o papel das citocinas na NPIQ, tais como a IL-1 β , ainda é um campo de estudo aberto e experimentos acerca da liberação de citocinas pelas células dos GRDs e também das implicações celulares da presença dessas proteínas no microambiente dos GRDs ainda precisam ser realizados.

Nossa outra hipótese da neuroproteção do extrato de *E. dysenterica* é no combate ao estresse oxidativo. Embora o papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) como moléculas indutoras de apoptose em células cancerígenas esteja bem estabelecido, o papel delas na neurotoxicidade induzida por quimioterápicos vem sendo amplamente discutido a partir das últimas duas décadas (JIANG *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2013; KELLEY *et al.*, 2014). Dessa forma, reestabelecer o equilíbrio entre EROs e agentes antioxidantes pode ser uma estratégia interessante de neuroproteção. Findaboylu e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento com inibidores da formação de EROs diminuía a resposta nociceptiva induzida pelo paclitaxel. Reforçando esse resultado, Yang e colaboradores (2018), verificaram que a oxaliplatina aumenta o RNAm de receptores TRPV1, que é revertido pelo tratamento com sulforafano, um ativador da via Nrf2/Keap1/ARE. Mais especificamente, há diversos estudos que mostraram benefício da redução do estresse oxidativo em

modelos de doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e Síndrome de Guillain-Barré (CUI *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2016), inclusive em modelo de neuropatia periférica *in vitro* induzida pela cisplatina, bortezomibe e oxaliplatina (KAWASHIRI *et al.*, 2018).

Destarte, primeiro investigamos a presença de EROs no nosso modelo de neurotoxicidade. Assim, no intuito de padronizar a técnica no nosso modelo de quantificação de EROs por ressonância paramagnética eletrônica, realizamos uma curva concentração-efeito da cisplatina em dois momentos pré-estipulados, 1 e 24 horas. Além disso, realizamos a quantificação em dois meios diferentes, o KHB e o meio de cultura F12. As concentrações de cisplatina e o tempo máximo de exposição foram escolhidas baseado em dados da literatura em que há indução de EROs pela cisplatina (KELLEY, *et al.*, 2014). Além disso, limitamos também o tempo de 1 hora para conseguir visualizar as EROs caso mecanismos intracelulares de controle de EROs fossem suficientes para contrapor o EO em 24 horas.

A primeira técnica que utilizamos para quantificar as EROs foi por ressonância paramagnética eletrônica e observamos que nenhuma das concentrações de cisplatina em qualquer dos tempos estipulados induziu aumento da síntese de EROs na cultura de células de GRDs, contrapondo dados bem estabelecidos da literatura (JIANG *et al.*, 2008; KELLEY *et al.* 2014; KHAZABOVA *et al.*, 2019). Diante desse resultado negativo, decidimos realizar duas curvas tempo-resposta de 0 até 120 minutos, com duas concentrações diferentes de cisplatina. Dessa maneira, presumimos que seria possível observar o aumento da síntese de EROs no nosso modelo em cultura de células de GRDs. Novamente, não observamos que o tratamento com cisplatina induzia a síntese aumentada de EROs, indicando que o antitumoral não induziu EO.

Uma vez que observamos resultados negativos contrastantes daqueles da literatura avaliamos se a ausência de efeito era em decorrência de uma possível degradação da *spin probe*. Assim, verificamos em amostras de sabido estresse oxidativo estabelecido e observamos que não havia problemas com o reagente de detecção. Assim, pressupomos que poderia haver interação química entre a *spin probe* e a cisplatina, o que explicaria tal ausência de efeito. Entretanto, não foi possível avaliar tal suposição e decidimos realizar os ensaios de detecção de EROs por fluorimetria. Então, reavaliamos o EO por fluorimetria no modelo de neurotoxicidade de células *neuron-like*, cultura de células PC-12 diferenciadas. Essas células são

oriundas de feocromocitoma de ratos da espécie *Rattus norvegicus* e seu uso decorre do fato delas compartilharem a mesma origem embrionária dos neurônios (UNSICKER *et al.*, 2005). Essa origem compartilhada faz com que essas células tenham características semelhantes aos neurônios e nos permite utilizá-las em estudos sobre função, desenvolvimento e diferenciação neuronal, sinalização intracelular e também em estudos de neurotoxicidade (GREENE E TISCHLER, 1976; LI *et al.*, 2017). Para que tais estudos sejam realizados, essas células precisam ser expostas a compostos estimulem sua diferenciação, como o NGF utilizado nesse trabalho, que cessa a divisão celular e promove alteração fenotípica (crescimento e desenvolvimento de neuritos), além de tornar as células eletricamente excitáveis (GREENE E TISCHLER, 1976; JANCSÓ, KIRALY E JANCSÓ-GÁRBOR, 1977). Assim, analisamos o efeito da cisplatina em duas concentrações (30 μ M e 100 μ M) por 1 hora. Ambos os tratamentos citados induziram aumento da fluorescência da diclorofluoresceína altamente fluorescente, produto gerado em decorrência da presença de EROs. Ainda, mostramos que 100 μ M de cisplatina induziu a síntese maior de EROs do que 30 μ M. Assim, indicando que a cisplatina induz EO no nosso modelo de neurotoxicidade, o que está de acordo com predições da literatura tanto em cultura de células PC-12 (LI *et al.*, 2015; SHOKOOHINIA *et al.*, 2017) quanto em cultura de células de GRDs (JIANG *et al.*, 2008; KELLEY *et al.*, 2014).

Visto que confirmamos o aumento da concentração de EROs pela cisplatina, o próximo passo foi verificar se o extrato de *E. dysenterica* induzia estresse oxidativo no nosso modelo de neurotoxicidade. Embora a atividade antioxidante da *E. dysenterica* esteja bem documentada na literatura (CLEMENTINO *et al.*, 2016; FERREIRA-NUNES *et al.*, 2018), decidimos confirmar a ausência de efeito indutor de EO no nosso modelo e excluir a interferência de componentes do extrato na fluorescência a ser mensurada. Assim, investigamos duas concentrações desse extrato e observamos que nenhuma delas induziu qualquer alteração da fluorescência avaliada, indicando ausência de EO no nosso modelo e também mostrou que não houve qualquer perturbação da fluorescência emitida, já que os valores foram similares ao do grupo controle e tal interferência incorreria na variação da mesma. Esses resultados corroboram os achados por Ávila e colaboradores (2016), em que células AMJ2-C11 foram tratadas com 80 μ g/mL de extrato de hidroalcóolico de *E. dysenterica* por 1 hora e não houve indução de EROs. Dessa forma, demos prosseguimento às nossas investigações.

Estabelecidas as concentrações da cisplatina que induzem EO, ausência de indução de EO pelo extrato, foi possível avaliar se o extrato era neuroprotetor em relação a esse aspecto da cisplatina. Dessa forma, as culturas de PC-12 diferenciadas foram pré-tratadas com o extrato de *E. dysenterica* por 23,5 horas e posteriormente foi adicionado à cultura o tratamento com o antitumoral por 1 hora. Observamos que o pré-tratamento com o extrato preveniu completamente o efeito da cisplatina, confirmando sua atividade antioxidante. Tal atividade pode ser em decorrência da atividade de duas principais moléculas encontradas nesse extrato, a quercetina e a catequina, como revisado por Xu e colaboradores (2019) e Bernatoniene e colaboradores (2018). Estudos apontam que esse efeito ocorre em decorrência de diversos mecanismos, tais como aumento da síntese de Nrf2 e à capacidade de eliminação direta de EROs por essas moléculas, onde há interrupção do ciclo de geração de tais moléculas (FAN *et. al.*, 2017; GRANADO-SERRANO *et. al.*, 2012). A atuação majoritária dessas duas moléculas, juntamente com outros componentes ainda desconhecidos, pode ter efeito aditivo em relação à atividade antioxidante observada. Por exemplo, em estudo com cultura celular de HepG2-C8, foi demonstrado que a quercetina possuía efeito antioxidante contra o estresse oxidativo causado pelo H₂O₂ apenas a partir de 25 µM (SAW *et al.*, 2014). O mesmo ocorre com a catequina, onde o pré-tratamento por 15 minutos com 10 µM desse composto induz uma redução parcial do estresse oxidativo induzido pelo cotratamento com 10 µM da proteína β amioide por 24 horas em cultura primária de neurônios corticais (BAN *et. al.*, 2006).

Buscando entender como as células neuronais respondem à neurotoxicidade da cisplatina, quantificamos a expressão gênica de SOD-2 e NRF2, ambas proteínas envolvidas no controle do estresse oxidativo. A SOD-2 é a enzima responsável por desmutar o radical superóxido, isto é, responsável por transformar o O₂⁻ em H₂O₂, um radical de oxigênio menos reativo, e em oxigênio molecular. Na célula, essa enzima é expressa constitutivamente e está presente na matriz mitocondrial para regulação de EROs produzidas pela cadeia transportadora de elétrons. Aqui, mostramos que o tratamento com cisplatina aumenta a expressão gênica dessa enzima nas culturas primárias de células GRDs. Esse aumento que observamos pode ser a resposta celular ao estresse oxidativo induzido pela cisplatina. Por exemplo, Jo e colaboradores (2019) mostraram que cultura celular de células auditivas *House Ear Institute-Organ of Corti 1* (HEI-OC1), havia aumento da expressão gênica dessa enzima após

tratamento com 30 μM de cisplatina por 15 horas, que é um resultado similar ao de Zhang e colaboradores (2020), em que o tratamento com 30 μM de cisplatina na mesma linhagem celular por 24 horas também aumentou tal expressão. Entretanto, não obtivemos modulação da expressão gênica de NRF2 na cultura de DRGs ou de células *neuron-like*. E esse resultado possa ser em decorrência da expressão dinâmica dessa proteína, em que a depender da duração do estímulo, há uma maior ou menor expressão desse receptor (ZHANG *et. al.*, 2020). Esses autores confeccionaram uma curva tempo-resposta de cisplatina (0, 8, 16 e 24 horas) em células HEI-OC1, e demonstraram que a expressão gênica de NRF2 se comportava com uma curva em “U” invertido. Esse mesmo efeito ocorreu com Granado-Serrano e colaboradores (2012), em que observaram o efeito dual sobre a expressão proteica de NRF2, que em células HepG2 há em um primeiro momento aumento da expressão (com pico em 60 minutos) e posteriormente redução, a partir de 2 horas até 18 horas de tratamento. Esse mesmo fenômeno pode estar acontecendo no nosso modelo, pois observamos a redução da expressão gênica dessa proteína após o tratamento com o extrato de *E. dysenterica* apenas na cultura primária de células de GRDs.

Uma maneira de avaliar então o papel do NRF2 seria avaliar a sua translocação para o núcleo celular, onde ocorre a sua ligação ao elemento responsivo antioxidante. Assim, pode ser que haja uma maior ligação dessa proteína ao DNA, como mostrado por Kawashiri e colaboradores (2018), em que foi observado uma maior ligação do NRF2 ao DNA em células PC-12 diferenciadas tratadas com 3 μM de oxaliplatina por 24 horas apesar dos dados da literatura apresentarem uma expressão dinâmica dessa proteína.

Em busca de avaliar se a neuroproteção do extrato de *E. dysenterica* frente ao estresse oxidativo da cisplatina envolvia a participação da via Nrf2/Keap1/ARE, avaliamos se ativadores específicos da via, sulforafano e oltipraz, tinham resultados similares aos observados pelo extrato sobre a função neuronal. Ressaltamos que as concentrações desses fármacos foram escolhidas baseado em dados já publicados na literatura. Um exemplo é que o tratamento com sulforafano nas concentrações de 10 e 20 μM por apenas 6 horas aumentou a síntese de proteínas neuronal e sináptica em cultura primária de neurônios corticais de camundongos da linhagem ICR (KIM *et al.*, 2017). Assim, decidimos construir uma curva concentração-efeito a partir dessas duas concentrações. Quanto ao oltipraz, a inibição da produção de NO_2^- em células

microgliais tratadas com LPS é alcançada com 50 μ M desse fármaco. Portanto, também construímos curva concentração-efeito para este fármaco em nosso modelo experimental de cultura primária de células de GRDs partindo desta concentração (FURGE *et al.*, 2004).

Diferentemente do extrato, ambos os ativadores aumentaram a liberação de CGRP quando as células foram expostas à capsaicina, porém, sem reduzir o conteúdo total desse peptídeo. Também observamos que a liberação de CGRP basal (pré e pós estímulo despolarizante) aumentou devido aos tratamentos com esses ativadores. Esse aumento da liberação de CGRP após estímulo pode ter ocorrido devido a alterações na quantidade de cálcio intracelular. Por exemplo, dimetil fumarato (DMF), um outro ativador da via Nrf2/Keap1/ARE, aumenta a concentração de cálcio intracelular em cultura primária de esplenócitos (HERRMANN *et al.*, 2019). Esse aumento do cálcio intracelular causado pelo DMF, caso ocorra também nos neurônios sensoriais, pode mobilizar mais vesículas sinápticas e consequentemente, liberar mais CGRP. Cabe ressaltar que esse efeito dos ativadores também foi diferente da cisplatina, uma vez que esse antitumoral induziu aumento da liberação de CGRP sem, no entanto, reduzir a quantidade total do peptídeo. Outra possível explicação para esse aumento da liberação de CGRP é que o receptor de neurotrofinas receptor de tropomiosina quinase A (TrkA), presente em neurônios peptidérgicos, isto é, aqueles que liberaram neuropeptídeos, é ativado pelo Nrf2 (KOSAKA *et al.*, 2010). Essa ativação desses receptores culmina na liberação de peptídeos. No entanto, baseado nos nossos experimentos, ainda não é possível descrever os mecanismos que possam estar envolvidos na modulação da atividade basal de liberação de CGRP.

Além de antioxidante e anti-inflamatória, ativação da via Nrf2/Keap1/ARE também induz crescimento de neuritos em células *neuron-like*. Kosaka e colaboradores (2010) demonstraram que o ácido carnosínico induzia o crescimento dessas estruturas neuronais em células PC-12 diferenciadas com colágeno IV via sinalização pelo receptor TrkA e ativação do Nrf2. Uma vez que a cisplatina reduz o comprimento dos neuritos (FERREIRA *et al.*, 2016), é possível que agentes com atividade antioxidante também induzam crescimento dos neuritos no nosso modelo de neuropatia periférica. Assim, avaliar a neuritogênese é uma estratégia interessante, visto que ela é considerada um fator preditivo de neuroplasticidade.

Para testar tal hipótese, tratamos células PC-12 diferenciadas com cisplatina, uma vez que agentes neurotóxicos que induzam alterações morfológicas nos

neurônios, tais como redução do tamanho de neuritos podem ser examinadas *in vitro* (DAS et al., 2004). Observamos redução dos neuritos em decorrência do tratamento com cisplatina, o que está em consonância com descrições prévias (KAWASHIRI, *et al.*, 2018), porém, essa redução não foi prevenida pelo tratamento com o extrato de *E. dysenterica*, indicando que o efeito neuroprotetor do extrato não abrange a morfologia celular. Baseado nos resultados apresentados, nossa hipótese é de que a neuroproteção mediada do extrato de *E. dysenterica* contra o estresse oxidativo da cisplatina ocorre por vias diferentes da ativação da via Nrf2/Keap1/ARE, tal como atuação direta dos seus componentes sobre as EROs, o que também explica a ausência de efeito sobre a neuritogênese, aqui avaliada.

Cabe ressaltar que ainda não está estabelecido se os antioxidantes são agentes preventivos da NPIQ. Em 2010, Carozzi e colaboradores compilaram em uma revisão de literatura estudos não-clínicos e clínicos sobre o papel do EO e o tratamento antioxidativo em neuropatia induzida por derivados da platina e verificaram o potencial uso de antioxidantes na NPIQ. Embora estudos clínicos sobre esse tema ainda tenham resultados conflitantes (ARGYRIOU *et al.*, 2006; KOTTSCHADE *et al.*, 2011; LEAL *et al.*, 2014), pode ser que o tratamento prévio com extratos de plantas tenha sucesso. Essa possibilidade advém da presença de inúmeros compostos nesses extratos que podem atuar em diferentes frentes contra a neuropatia. Um exemplo são flavonoides, que atuam diretamente bloqueando a produção de EROs (AZEVEDO *et al.*, 2013) e tem atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (AGARWAL, 1982; FERRÁNDIZ e ALCARAZ, 1991; TALL e RAJA, 2004).

Além disso, é importante enfatizar que a NP causada pelos quimioterápicos é diferente de outras neuropatias em relação ao seu tratamento. No caso na NPIQ, é possível realizar tratamento preventivo, uma vez que o seu início pode ser programado. Essa característica confere à NPIQ uma posição de destaque frente às demais neuropatias periféricas, pois sabendo do início do tratamento antitumoral, é possível que o paciente tenha efeitos adversos reduzidos ou ausentes.

É necessário que confirmemos os achados nas células *neuron-like* sobre o estresse oxidativo e sobre o crescimento de neuritos nos neurônios sensoriais presentes na cultura primária de células de GRDs, sendo essa portanto, limitações desse estudo. É pertinente salientar ainda que esses são resultados provenientes de análises dos resultados de culturas celulares, logo, eles excluem a complexidade das interações entre as células e tecidos de um organismo vivo, sendo essa, portanto,

outra limitação desse estudo. Apesar do modelo *in vitro* de NPIQ ser extremamente importante para isolar as alterações que ocorrem com os gânglios das raízes dorsais durante e após o tratamento quimioterápico, é crucial ter prudência ao extrapolar esses dados para o que ocorre *in vivo*. Infelizmente, uma importante barreira para o uso de extratos é a necessidade da sua padronização e a escassez de estudos científicos acerca das suas atividades biológicas, especialmente em relação ao extrato da *E. dysenterica*.

De forma mais ampla, estudos de etnofarmacologia, como este aqui apresentado fortalecem a farmacologia e pesquisas nesse campo de conhecimento são de suma importância para o avanço da terapêutica. Devido ao seu tamanho continental e características geográficas, o Brasil nos oferece inúmeras possibilidades de uso sustentável das plantas, o que significa que é possível explorar conscientemente diversos extratos de plantas, como preconizado pela economia verde.

Os extratos por sua vez são um concentrado de diferentes moléculas extraídas com potencial efeito biológico. Esse é o principal motivo de estímulo do seu uso, uma vez que os compostos com atividades farmacológicas podem ter efeitos aditivos e até mesmo sinérgicos, em relação à determinado efeito. Além disso, esses extratos podem atuar em diferentes frentes no combate a determinadas patologias, que não são alcançados com o uso de apenas uma molécula isolada. Além disso, seu uso se torna plausível em decorrência da facilidade de obtenção e baixo custo de produção, diferentemente dos compostos isolados. Todas essas características colocam os extratos de produtos naturais, como os oriundos de plantas, em posição de destaque na ciência brasileira

6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, exploramos os efeitos do extrato de *E. dysenterica* no modelo de NPIQ *in vitro* e demonstramos que ele não é tóxico para a cultura de células de GRDs e que não interfere na atividade antitumoral da cisplatina. Além disso, previne o aumento da sensibilidade neuronal induzido pela cisplatina, bem como o estresse oxidativo. Mostramos que a cisplatina induz processo inflamatório e modula a expressão gênica de mediadores antioxidantes, além de mostrarmos que a ativação da via Nrf2/Keap1/ARE em neurônios sem estresse oxidativo induz sensibilização neuronal. Por fim, mostramos que o citado extrato não interfere no crescimento de neuritos alterado pela cisplatina.

Em relação ao extrato de *E. dysenterica* mostramos que ele é neuroprotetor no modelo de NPIQ apresentado e tais resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos e sobre a neuroproteção da NPIQ, sendo, portanto, um promissor agente farmacológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, Wessam M; MOUSSA, Farouzia I. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 13, p. 1155–1162, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S191240>

AGARWAL, O. P. The anti-inflammatory action of nepitrin, a flavonoid. **Agents and Actions**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 298–302, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01965393>

AMARA, Susan G. *et al.* Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. **Nature**, [s. l.], v. 298, n. 5871, p. 240–244, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/298240a0>

ARGYRIOU, Andreas A. *et al.* A randomized controlled trial evaluating the efficacy and safety of vitamin E supplementation for protection against cisplatin-induced peripheral neuropathy: final results. **Supportive Care in Cancer**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 1134–1140, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00520-006-0072-3>

AVAN, Abolfazl; *et al.* Platinum-Induced Neurotoxicity and Preventive Strategies : Past , Present , and Future. **The Oncologist**, [s. l.], p. 411–432, 2015.

ÁVILA, Renato Ivan de *et al.* *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) exerts chemopreventive effects against hexavalent chromium-induced damage in vitro and in vivo. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 54, n. 11, p. 2652–2663, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1178306>

AZEVEDO, Maria Isabel *et al.* The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular pain**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 53–67, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1744-8069-9-53>

BAN, Ju Yeon *et al.* Catechin and epicatechin from *Smilacis chinae* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid β protein (25-35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation. **Life Sciences**, [s. l.], v. 79, n. 24, p. 2251–2259, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.07.021>

BARAJON, Isabella *et al.* Neuropeptides and morphological changes in cisplatin-induced dorsal root ganglion neuronopathy. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 138, n. 1, p. 93–104, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0050>

BERNATONIENE, Jurga; KOPUSTINSKIENE, Dalia. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 965, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23040965>

BRANDOLINI, Laura *et al.* **Chemokine signaling in chemotherapy-induced neuropathic pain**. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20122904>

BURKEY, Thomas H; HINGTGEN, Cynthia M; MICHAEL R. VASKO, Michael R. Isolation and culture of sensory neurons from the dorsal-root ganglia of embryonic or adult rats. *In*: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (org.). **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. v. 99, p. 189–202. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

BUTTURINI, Elena *et al.* Mild oxidative stress induces S-glutathionylation of STAT3 and enhances chemosensitivity of tumoural cells to chemotherapeutic drugs. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 65, p. 1322–1330, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.015>

CALIXTO, JOÃO B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 91, n. suppl 3, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105>

CANTA, Annalisa; POZZI, Eleonora; CAROZZI, Valentina Alda. Mitochondrial dysfunction in chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). **Toxics**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 198–223, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxics3020198>

CAO, Zhe *et al.* Uridine homeostatic disorder leads to DNA damage and tumorigenesis. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 372, n. 2, p. 219–225, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.007>

CARDOSO, Leandro de Moraes *et al.* Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 2151–2154, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.005>

CAROZZI, VA; CANTA, A; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: what do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 596, n. 2, p. 90–107, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.014>

CAROZZI, VA.; MARMIROLI, P.; CAVALETTI, G. The Role of Oxidative Stress and Anti-Oxidant Treatment in Platinum-Induced Peripheral Neurotoxicity. **Current Cancer Drug Targets**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 670–682, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156800910793605820>

CARVALHO, Larissa F; SILVA, Ana Maria F; CARVALHO, Adriana A. The use of antioxidant agents for chemotherapy-induced peripheral neuropathy treatment in animal models. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 971–979, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12803>

CAVALETTI, G.; *et al.* Tissue platinum concentrations and cisplatin schedules Capsaicin for treatment of post-traumatic amputation stump pain. **The Lancet**, [s. l.], v. 336, n. 8721, p. 1003, 1990.

CAVALETTI, G *et al.* Cisplatin-induced peripheral neurotoxicity is dependent on total-dose intensity and single-dose intensity. **Cancer**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 203–207, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920101\)69:1<203::aid-cncr2820690133>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920101)69:1<203::aid-cncr2820690133>3.0.co;2-1)

CAVALETTI, Guido *et al.* Chemotherapy-Induced Neuropathy. **Current Treatment Options in Neurology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 180–190, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11940-010-0108-3>

CAVALETTI, Guido *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: A multifaceted, still unsolved issue. **Journal of the Peripheral Nervous System**, [s. l.], v. 24, n. S2, p. S6–S12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jns.12337>

CAVALETTI, Guido; MARMIROLI, Paola. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. **Nature reviews neurology**, [s. l.], v. 6, p. 535–546, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/14740338.3.6.535>

CHANG, Wonseok *et al.* Expression and Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Human Dorsal Root Ganglion Neurons with Special Focus on Nav1.7, Species Differences, and Regulation by Paclitaxel. **Neuroscience Bulletin**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 4–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0132-3>

CHEN, Qian *et al.* Activation of the NRF2-ARE signalling pathway by the Lentinula edodes polysaccharose LNT alleviates ROS-mediated cisplatin nephrotoxicity. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 36, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.007>

CHEN, Tielong *et al.* Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway in vitro. **Medicine**, [s. l.], v. 99, n. 38, p. e22241, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022241>

CLEMENTINO, Silva Elton *et al.* Voltammetric and spectrophotometric determination of antioxidant activity of Eugenia dysenterica DC leaves extracts. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 535–540, 2016.

COLVIN, Lesley A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: where are we now? **Pain**, [s. l.], v. 160, n. 5, p. S1–S10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001540>

COSTA, Théo R. *et al.* Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 111–117, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00214-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00214-2)

CRISTIANA, Filip; NINA, Zamosteanu; ELE, Albu. Homocysteine in Red Blood Cells Metabolism - Pharmacological Approaches. *In*: BLOOD CELL - AN OVERVIEW OF STUDIES IN HEMATOLOGY. [S. l.]: InTech, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/47795>

CUI, Yuan Bo *et al.* Pharmacological activation of the Nrf2 pathway by 3H-1, 2-dithiole-3-thione is neuroprotective in a mouse model of Alzheimer disease. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 336, p. 219–226, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.09.011>

DAS, Trina *et al.* Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 121–129, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.12.006>

DASARI, Shaloam;; TCHOUNWOU, Paul Bernard. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 740, p. 364–378, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>. Cisplatin

DI CESARE MANNELLI, Lorenzo *et al.* Glial role in oxaliplatin-induced neuropathic pain. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 261, p. 22–33, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.06.016>

FAN, Fei-Yan; SANG, Li-Xuan; JIANG, Min. Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 484, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22030484>

FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and Actions**, [s. l.], v. 32, n. 3–4, p. 283–288, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01980887>

FERREIRA-NUNES, Ricardo *et al.* Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 265, p. 408–415, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.023>

FERREIRA, Rafaela Scalco *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**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 2993–3003, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2019-5>

FIDANBOYLU, Mehmet; GRIFFITHS, Lisa A.; FLATTERS, Sarah J L. Global inhibition of reactive oxygen species (ROS) inhibits paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 9, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025212>

FIDELIS-DE-OLIVEIRA, Patrícia *et al.* Hypotensive effect of *Eugenia dysenterica* leaf extract is primarily related to its vascular action: The possible underlying mechanisms. *Journal of ethnopharmacology*, v. 251, p. 112520, 2020.

FURGE, Laura Lowe *et al.* Oltipraz inhibits inducible nitric oxide synthase in vitro and

inhibits nitric oxide production in activated microglial cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 424, n. 2, p. 163–170, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.02.018>

GALHEIGO, Maria Raquel Unterkircher et al. Antidiarrhoeic effect of *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaf essential oil. *Natural Product Research*, v. 30, n. 10, p. 1182-1185, 2016.

GASCA, Cristian A. *et al.* Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 109, p. 996–1002, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.032>

GEORGIADIS, Millie M *et al.* Small molecule activation of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 reduces DNA damage induced by cisplatin in cultured sensory neurons. **DNA Repair**, [s. l.], v. 41, p. 32–41, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.03.009>

GLENDENNING, Jennifer L. *et al.* Long-term neurologic and peripheral vascular toxicity after chemotherapy treatment of testicular cancer. **Cancer**, [s. l.], v. 116, n. 10, p. 2322–2331, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.24981>

GOLD, Michael S; GEBHART, Gerald F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1248–1257, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.2235>

GRANADO-SERRANO, Ana Belén *et al.* Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 195, n. 2, p. 154–164, 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.12.005>

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, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 2424–2428, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>

GREGG, By Richard W *et al.* Cisplatin Neurotoxicity: The Relationship Between Dosage, Time, and Platinum Concentration in Neurologic Tissues, and Morphologic Evidence of Toxicity. [s. l.], v. 10, n. 5, p. 795–803, 1992.

GUO, Liang *et al.* Multiparametric image analysis of rat dorsal root ganglion cultures to evaluate peripheral neuropathy-inducing chemotherapeutics. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 156, n. 1, p. 1–14, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw254>

HAN, Ranran *et al.* Dimethyl fumarate attenuates experimental autoimmune neuritis through the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2/hemoxygenase-1 pathway by altering the balance of M1/M2 macrophages. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–14, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0559-x>

HARDER, Harold C.; ROSENBERG, Barnett. Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro. *International Journal of Cancer*, v. 6, n. 2, p. 207-216, 1970.

HAWKINS, Clare L.; DAVIES, Michael J. Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**

- **General Subjects**, [s. l.], v. 1840, n. 2, p. 708–721, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.034>

HERRMANN, Ann-Kathrin *et al.* Dimethyl fumarate alters intracellular Ca²⁺ handling in immune cells by redox-mediated pleiotropic effects. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 141, n. April, p. 338–347, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.005>

HERSHMAN, Dawn 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**, [s. l.], v. 32, p. 1941–1967, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.0914>

HINGTGEN, Cynthia M.; VASKO, Michael R. Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. **Brain Research**, [s. l.], v. 655, n. 1–2, p. 51–60, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91596-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91596-2)

HOWLE, Jerry A.; GALE, Glen R. cis-Dichlorodiammineplatinum (II): persistent and selective inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in vivo. *Biochemical pharmacology*, v. 19, n. 10, p. 2757-2762, 1970.

HU, Lang-yue *et al.* Prevention and Treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: therapies based on CIPN mechanisms. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 17, p. 184–196, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170915143217>

HUANG, Chaoqun *et al.* MicroRNA and mRNA expression profiling in rat acute

respiratory distress syndrome. **BMC medical genomics**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 46, 2014.
Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-46>

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).
Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. - Rio de Janeiro: INCA, 2019.
MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS).

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).
INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025 - Rio de Janeiro: 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em 07 de jan. de 2023

JAGGI, Amteshwar Singh; SINGH, Nirmal. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. **Toxicology**, [s. l.], v. 291, p. 1–9, 2012.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.10.019>

JANCSÓ, G.; KIRALY, ELISABETH; JANCSÓ-GÁRBOR, AURELIA.
Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, [s. l.], v. 270, n. 5639, p. 741–743, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/270741a0>

JIANG, Y *et al.* Implications of Ape1 in reactive oxygen signaling response following cisplatin treatment of dorsal root ganglion neurons. **Cancer Research**, [s. l.], v. 68, n. 15, p. 6425–6434, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08->

1173.Implications

JIMENEZ-ANDRADE, Juan M *et al.* Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. **Molecular pain**, [s. l.], v. 4, p. 10, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-10>

JO, Eu-Ri *et al.* The protective role of ferulic acid against cisplatin-induced ototoxicity. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, [s. l.], v. 120, n. September 2018, p. 30–35, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2019.02.001>

KALENDER, Yusuf *et al.* Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 141–148, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.008>

KASHIMA, Midori. Effects of Catechins on Superoxide and Hydroxyl Radical. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 279–283, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/cpb.47.279>

KAWASHIRI, Takehiro *et al.* Dimethyl fumarate ameliorates chemotherapy agent-induced neurotoxicity in vitro. **Journal of Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 137, n. 2, p. 202–211, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.06.008>

KELLEY, Mark R. *et al.* Role of the DNA base excision repair protein, APE1 in cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin induced sensory neuropathy. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106485>

KERCKHOVE, Nicolas *et al.* Long-Term Effects, Pathophysiological Mechanisms, and Risk Factors of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathies: A Comprehensive Literature Review. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 8, n. FEB, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00086>

KHASABOVA, Iryna A. *et al.* Pioglitazone, a PPAR γ agonist, reduces cisplatin-evoked neuropathic pain by protecting against oxidative stress. **Pain**, [s. l.], v. 160, n. 3, p. 688–701, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001448>

KIM, Geon Ha *et al.* The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 325–340, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>

KIM, Jisung *et al.* Sulforaphane epigenetically enhances neuronal BDNF expression and TrkB signaling pathways. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 1600194, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600194>

KO, Miao-Hwa *et al.* Peptidergic intraepidermal nerve fibers in the skin contribute to the neuropathic pain in paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Neuropeptides**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 109–117, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2014.02.001>

KOSAKA, Kunio *et al.* Role of Nrf2 and p62/ZIP in the neurite outgrowth by carnosic acid in PC12h cells. **Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 147, n. 1, p. 73–81, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jb/mvp149>

KOTTSCHADE, Lisa A. *et al.* The use of vitamin E for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: results of a randomized phase III clinical trial. **Supportive Care in Cancer**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 1769–1777, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00520-010-1018-3>

KRUKOWSKI, Karen *et al.* Prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy by the small-molecule inhibitor pifithrin- μ . **Pain**, [s. l.], v. 156, n. 11, p. 2184–2192, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000290>

KUAI, Cui-Ping *et al.* Corydalis saxicola Alkaloids Attenuate Cisplatin-Induced Neuropathic Pain by Reducing Loss of IENF and Blocking TRPV1 Activation. **The American Journal of Chinese Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 02, p. 407–428, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1142/S0192415X20500214>

KUMARI, D. *et al.* The role of DNA damage response pathways in chromosome fragility in Fragile X syndrome. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 37, n. 13, p. 4385–4392, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp391>

LEAL, Alexis D *et al.* North Central Cancer Treatment Group/Alliance trial N08CA-the use of glutathione for prevention of paclitaxel/carboplatin-induced peripheral neuropathy: A phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Cancer**, [s. l.], v. 120, n. 12, p. 1890–1897, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.28654>

LEDEBOER, Annemarie *et al.* Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 21, p. 686–698, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.10.012>

LEO, Markus *et al.* Platinum-Based Drugs Cause Mitochondrial Dysfunction in Cultured Dorsal Root Ganglion Neurons. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 22, p. 8636, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21228636>

LI, Da-wei *et al.* Attenuation of Cisplatin-Induced Neurotoxicity by Cyanidin, a Natural Inhibitor of ROS-Mediated Apoptosis in PC12 Cells. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 995–1001, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0194-6>

LI, Jian-Ri *et al.* Susceptibility of naïve and differentiated PC12 cells to Japanese encephalitis virus infection. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 79–87, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/iub.1595>

LI, Mingzhu *et al.* Huangqi Guizhi Wuwu Decoction can prevent and treat oxaliplatin-induced neuropathic pain by TNF α /IL-1 β /IL-6/MAPK/NF-kB pathway. **Aging**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 5013–5022, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/aging.203794>

LI, Yan *et al.* DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 Is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and in Humans with Neuropathic Pain. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 1124–1136, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0899-17.2017>

LI, Zhen-Yu *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**, [s. l.], v. 30, p. 55–63, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00540-015-2077-x>

LIMA, T.B. *et al.* Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. **Peptides**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1426–1433, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.05.003>

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**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LOMONACO, Mauro *et al.* Cisplatin neuropathy: clinical course and neurophysiological findings. **Journal of Neurology**, [s. l.], v. 239, p. 199–204, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00839140>

LOPRINZI, Charles L. *et al.* Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: ASCO guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 38, n. 28, p. 3325–3348, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01399>

MA, Jiacheng *et al.* Beyond symptomatic relief for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Targeting the source. **Cancer**, [s. l.], v. 124, n. 11, p. 2289–2298, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.31248>

MARTINOTTO, Cristiano *et al.* **Cagaiteira (Eugenia dysenterica DC.)**. [S. l.]: UFLA, 2008.

MCWHINNEY, Sarah R; GOLDBERG, Richard M; MCLEOD, Howard L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Molecular cancer therapeutics**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 10–16, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0840>

MELLI, Giorgia; HÖKE, Ahmet. Dorsal root ganglia sensory neuronal cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s. l.], v. 4, n. 10, p. 1035–1045, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17460440903266829>

MELLO, Victor Carlos *et al.* Development of New Natural Lipid-Based Nanoparticles Loaded with Aluminum-Phthalocyanine for Photodynamic Therapy against Melanoma. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 12, n. 20, p. 3547, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano12203547>

MENDIOLA, Andrew S.; CARDONA, Astrid E. The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 125, n. 5, p. 781–795, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1732-9>

MINISTERIO DA CIENCIA, Tecnologia e Inovação. **Diretrizes da pratica de eutanasia do CONCEA**. [S. l.: s. n.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO;; CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos**. [S. l.: s. n.], 2013. *E-book*.

MOLS, Floortje *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neuropathy and its

association with quality of life: A systematic review. **Supportive Care in Cancer**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 2261–2269, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2255-7>

MYERS, Norman *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, [s. l.], v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35002501>

NETTER, Frank H. **Atlas of Human Anatomy - Sixth edition**. [S. l.: s. n.], 2013. ISSN 1098-6596.v. 53 Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

OLIVEIRA, Henrique Rodrigues *et al.* Cisplatin-induced changes in calcitonin gene-related peptide or TNF- α release in rat dorsal root ganglia in vitro model of neurotoxicity are not reverted by rosiglitazone. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 93, n. October, p. 211–221, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.10.002>

PARK, Hue Jung *et al.* Toll-like receptor signaling regulates cisplatin-induced mechanical allodynia in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 25–34, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2304-9>

PARK, S *et al.* Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 29, p. 3081–3094, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986708786848569>

PASSOS, Giselle F. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of**

Ethnopharmacology, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.032>

PITTMAN, Sherry K. *et al.* Paclitaxel alters the evoked release of calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons in culture. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 253, n. 317, p. 146–153, 2014. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.12.011>

POPOVIĆ, Jelena *et al.* Neuroprotective Role of Selected Antioxidant Agents in Preventing Cisplatin-Induced Damage of Human Neurons In Vitro. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 619–636, 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.1007/s10571-019-00667-7>

RODRIGUES, Eduardo B. *et al.* Mating system and pollen dispersal in *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) germplasm collection: tools for conservation and domestication. **Genetica**, [s. l.], v. 144, n. 2, p. 139–146, 2016. Disponível em:
<https://doi.org/10.1007/s10709-016-9884-3>

ROSENBERG, Barnett; VAN CAMP, Loretta; KRIGAS, Thomas. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, v. 205, n. 4972, p. 698-699, 1965.

ROSENBERG, Barnett *et al.* Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *nature*, v. 222, n. 5191, p. 385-386, 1969.

SAADATI, Hakimeh *et al.* The Neuroprotective Effect of Mesna on Cisplatin-Induced Neurotoxicity: Behavioral, Electrophysiological, and Molecular Studies. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 826–840, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s12640-020-00315-9>

SALAT, Kinga. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: part 1—current state of knowledge and perspectives for pharmacotherapy. **Pharmacological Reports**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 486–507, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00109-y>

SANTOS, Mayara Simonelly Costa dos *et al.* Nanographene oxide-methylene blue as phototherapies platform for breast tumor ablation and metastasis prevention in a syngeneic orthotopic murine model. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0333-6>

SAW, Constance Lay Lay *et al.* The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 72, p. 303–311, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.07.038>

SCHÄFERS, Maria; SORKIN, Linda. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 437, n. 3, p. 188–193, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.03.052>

SERETNY, Marta *et al.* Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. **Pain**, [s. l.], v. 155, n. 12, p. 2461–2470, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.020>

SHIM, Hyun Soo *et al.* [EXPRESS] Peripheral and central oxidative stress in chemotherapy-induced neuropathic pain. **Molecular Pain**, [s. l.], p. 1–28, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1744806919840098>

SHOKOOHINIA, Yald *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**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 438–445, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.22038/ijbms.2017.8587>

SIES, Helmut. **Oxidative Stress - First edition**. ISBN: 978-0-12-642760-8. v. 1. Academic Press. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780126427608/oxidative-stress>

SILVA, Sandra Márcia Mazuti *et al.* EUGENIA DYSENTERICA MART. EX DC. (CAGAITA): PLANTA BRASILEIRA COM POTENCIAL TERAPÊUTICO. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 49–95, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.14450/2318-9312.v27.e1.a2015.pp49-95>

SILVEIRA, CONCEIÇÃO E. S. *et al.* Strategies of plant establishment of two Cerrado species: *Byrsonima basiloba* Juss. (Malpighiaceae) and *Eugenia dysenterica* Mart. ex DC (Myrtaceae). **Plant Species Biology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 130–137, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2012.00366.x>

SIMÓ, Marta *et al.* Chemobrain: A systematic review of structural and functional neuroimaging studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 1311–1321, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.015>

SOUZA, Gabriel Moreira de. **CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE GAP-43 COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO ZIKA VÍRUS EM CÉLULAS PC-12**. 2019. - Universidade de

Brasília, [s. l.], 2019.

SOUZA, Paula de *et al.* Inhibitory Activity of α -Amylase and α -Glucosidase by Plant Extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, [s. l.], v. 78, n. 04, p. 393–399, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280404>

STAROBOVA, Hana; VETTER, Irina. Pathophysiology of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. May, p. 1–21, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00174>

STRASSBURG, Bernardo B. N. *et al.* Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology & Evolution**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 0099, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0099>

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**, [s. l.], v. Appendix 3, p. 2–3, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>

STRUMBERG, D. *et al.* Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 229–236, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf058>

SUNDARAJAN, S *et al.* PPAR γ as a therapeutic target in central nervous system diseases. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 136–144, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.03.020>

TALL, Jill M.; RAJA, Srinivasa N. Dietary Constituents as Novel Therapies for Pain. **The Clinical Journal of Pain**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 19–26, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00002508-200401000-00005>

THOMAZ, Douglas Vieira *et al.* Antioxidant and neuroprotective properties of Eugenia dysenterica leaves. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/8601028>

TOMLINSON, DR; FERNYHOUGH, P; DIEMEL, LT. Neurotrophins and peripheral neuropathy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 351, n. 1338, p. 455–462, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0042>

TONELLI, Claudia; CHIO, Iok In Christine; TUVESON, David A. Transcriptional Regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 29, n. 17, p. 1727–1745, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>

TSUDA, Makoto; INOUE, Kazuhide; SALTER, Michael W. Neuropathic pain and spinal microglia: A big problem from molecules in “small” glia. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 101–107, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.12.002>

ULLAH, Rahim *et al.* Attenuation of nociceptive and paclitaxel-induced neuropathic pain by targeting inflammatory, CGRP and substance P signaling using 3-Hydroxyflavone. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 144, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.104981>

UNSICKER, Klaus *et al.* The Chromaffin Cell and its Development. **Neurochemical**

Research, [s. l.], v. 30, n. 6–7, p. 921–925, 2005. Disponível em:
<https://doi.org/10.1007/s11064-005-6966-5>

URITS, Ivan *et al.* An evidence-based review of CGRP mechanisms in the propagation of chronic visceral pain. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 507–516, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.bpa.2020.06.007>

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>

VIEIRA, Pabline Marinho *et al.* Detection of Genotoxic, Cytotoxic, and Protective Activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in Mice. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 563–567, 2012. Disponível em:
<https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0270>

VITEK, Renan *et al.* Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 31, n. 16, p. 1930–1934, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1261343>

WANG, Hong; JOSEPH, James A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader¹¹Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee by the United States Department of Agriculture and does not imp. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 5–6, p. 612–616, 1999. Disponível em:
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0)

WASEEM, Mohammad *et al.* Role of Mitochondrial Mechanism in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Current Drug Metabolism**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 47–54, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389200219666171207121313>

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond Neurons: Evidence That Immune and Glial Cells Contribute to Pathological Pain States. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 981–1011, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2002>

WINDEBANK, Anthony J; GRISOLD, Wolfgang. Chemotherapy-induced neuropathy. **Journal of the Peripheral Nervous System**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 27–46, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2008.00156.x>

WOLF, Sherry *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Prevention and treatment strategies. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 44, n. 11, p. 1507–1515, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.04.018>

WOOLF, Clifford J.; MA, Qiufu. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, [s. l.], v. 55, p. 353–364, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.016>

XU, Dong *et al.* Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1123, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>

YANG, Yang *et al.* Nrf2 inhibits oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via protection of mitochondrial function. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 120, n. March, p. 13–24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.007>

ZHANG, Hongmei *et al.* Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **The Journal of Pain**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 775–786, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.02.011>

ZHANG, Meijuan *et al.* Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 30–47, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.09.003>

ZHANG, Weijian *et al.* Nrf2 activation protects auditory hair cells from cisplatin-induced ototoxicity independent on mitochondrial ROS production. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 331, n. April, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.04.005>

ZHOU, Ya-qun *et al.* Nrf2 activation ameliorates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1041–1048, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0394-6>

ZHU, Jing *et al.* Ethoxyquin provides neuroprotection against cisplatin-induced neurotoxicity. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. January, p. 28861, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep28861>

8. ANEXO 1

CERTIFICADOS DA CEUA

	
	Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal
Brasília, 02 de julho de 2014.	
DECLARAÇÃO	
Declaramos que o projeto intitulado " ESTUDO DE PRODUTOS NATURAIS DO BIOMA CERRADO COM POTENCIAL ATIVIDADE DE NEUROPROTEÇÃO ", UnBDoC n.º 51793/2014, sob responsabilidade da Professora Djane Braz Duarte foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.	
Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior Coordenador da CEUA	
*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.	

**Universidade de Brasília****Comissão de Ética no Uso Animal**

Brasília, 17 de dezembro de 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**ESTUDO DO POTENCIAL PAPEL NEUROPROTETOR DE EXTRATOS AQUOSOS DE EUGENIA DYSENTERICA DC E MORUS NIGRA EM MODELO DE NEUROTOXICIDADE PERIFÉRICA INDUZIDA POR CISPLATINA IN VITRO**”, SEI n.º 23106.106926/2021-68, sob responsabilidade da Professora Djane Braz Duarte, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 165ª reunião ordinária, realizada em 26/11/2021. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus* – Wistar (54 machos e fêmeas), com procedência do Biotério Central da UniEVANGÉLICA (Anápolis- GO). O presente certificado é válido pelo período de 17/12/2021 a 01/12/2022.

*Carina Krewer*

Dra. Carina da Costa Krewer

Coordenadora da CEUA – UnB



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

9. ANEXO 2

CARTA À COMUNIDADE

Foi tentando entender e extrair ao máximo o que o nosso Cerrado nos oferece, que essa pesquisa foi realizada. Foi idealizada por cientistas que estavam e ainda estão preocupados com problemas que afetam a nossa saúde. Nesse trabalho, nós investigamos uma planta nativa do Cerrado, a Cagaita, e buscamos verificar se ela tinha algum efeito sobre a neuropatia periférica, um efeito ruim que acontece rotineiramente com pessoas que têm que fazer quimioterapia para tratar o câncer. Em último caso, a neuropatia dos quimioterápicos reduz a qualidade de vida dos pacientes. Nesse trabalho nós avaliamos se o extrato das folhas da Cagaita era bom contra a toxicidade da cisplatina (um quimioterápico muito utilizado, inclusive em câncer de pulmão) e descobrimos nas nossas análises que a Cagaita não era tóxica para nossos neurônios e que não atrapalhava o tratamento quimioterápico. Isso é extremamente importante, pois é o primeiro passo indicando que há chances de que achemos algum tratamento para a neuropatia citada. Também descobrimos que a Cagaita é protetora de alguns mecanismos tóxicos da cisplatina, como proteção direta de atividade dos neurônios e também contra o estresse oxidativo (aquele sempre falado no envelhecimento, mas que está presente em diversas doenças e sintomas, como aqui).

Esses resultados são muito importantes, pois abrem as portas para futuras pesquisas. Pode ser que tenhamos aqui no Cerrado, escondido em alguma folha, semente ou fruto, o tratamento de um problema que afeta não só os brasileiros, mas também cidadãos do mundo inteiro. A Cagaita que investigamos, se mostrou promissora, mas precisamos realizar vários outros testes para afirmar que ela protege os pacientes da neuropatia. Quem sabe futuramente não podemos fazer tratamento com fitoterápicos dessa planta juntamente com a quimioterapia?

Nossas plantas são baús de tesouro a serem achados, são livros excelentes ainda a serem lidos, são músicas maravilhosas a serem ouvidas. Nós já temos o Acheflan, um remédio bastante utilizado que foi desenvolvido e produzido no Brasil a partir da nossa flora, e diante desse fato, me pergunto: o que mais ainda há para ser descoberto? Quais doenças podemos tratar? Quanto ainda conseguimos ajudar?

Essas perguntas guiam todo cientista e os esforços da comunidade científica são para que a vida do ser humano seja facilitada ao máximo e mais especificamente, nós da área da saúde, buscamos que nossa vida seja mais longa possível da melhor forma disponível. Nesses tempos obscuros, difíceis e de negacionismo, valorizar a ciência é o caminho para o progresso. É uma via de mão dupla e isso significa que investir no nosso trabalho é o caminho para o desenvolvimento da nossa espécie, pois quando o cientista acerta, é a população que colhe os louros.

Cá estamos, **GRAÇAS À CIÊNCIA**. Viva a ciência e um viva à ciência!

Henrique Rodrigues de Oliveira