

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

# PROJETO DE PESQUISA

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ÁCIDO VALPRÓICO E DA VITAMINA E NA TOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E NEUROQUIMICA.**

**MICHELE ALBUQUERQUE JALES DE CARVALHO**

**Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles**

**Coorientadora: Profa. Dra. Juvenia Bezerra Fonteneles**

**FORTALEZA,**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**PROJETO DE PESQUISA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ÁCIDO VALPRÓICO E DA VITAMINA E NA TOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E NEUROQUIMICA**

RESUMO

A cisplatina é um fármaco quimioterápico anticâncer usado para tratamento de diversos tipos de câncer, porém causa sérios efeitos tóxicos, inclusive no SNC. O ácido valpróico é um fármaco antiepiléptico, utilizado na atualidade também como estabilizador de humor e estudos recentes apontam para suas propriedades neuroprotetoras. A vitamina E é um potente antioxidante que possui diversos efeitos benéficos ao organismo. O objetivo do estudo será avaliar os efeitos do ácido valpróico e da vitamina E na neurotoxicidade induzida por cisplatina. Será realizado tratamento de prevenção e reversão. Os animais serão tratados com cisplatina por cinco semanas consecutivas e será administrado 5mg/kg/semana. A prevenção será iniciada com a administração de ácido valproico (100mg/kg/dia) e/ou de vitamina E (50mg/kg/dia) sete dias antes de iniciar o tratamento com cisplatina. Na reversão o ácido valproico e a vitamina E serão iniciados na segunda semana de tratamento com cisplatina. Os testes comportamentais Campo aberto, NOR e Y maze serão realizados no inicio do tratamento, no sétimo dia do tratamento de prevenção e no final do tratamento. Em seguida os animais serão sacrificados, as áreas cerebrais: hipocampo, córtex pré-frontal e temporal serão dissecados para ánalise de EO (atividade da superóxido dismutase (SOD), dosagem de glutationa reduzida (GSH), determinação da peroxidação lipídica, nitrito e MPO), inflamatórios e antiinflamatórios (citocinas como IL-1β, TNFα; IL-10, TGFβ e o fator de transcrição NFkB) e de neuroplasticidade (dosagem do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e da glicogênio sintase quinase-3 β (GSK3β). Será realizado biomarcação por imunofluorêscencia dos marcadores GFAP e Fosfocreb, NFκB e NeuN e expressão gênica de iNOS e AchE por qPCR no hipocampo. A análise estatística será através ANOVA e teste de Student Newman Keuls. O critério de significância será p< 0,05.

|  |  |
| --- | --- |
| 1. **INTRODUÇÃO** | 4 |
| 1.1. Cisplatina | 4 |
| 1.2. Cisplatina e déficit cognitivo | 6 |
| 1.3. Acido Valproico | 8 |
| 1.4. Inflamação, Estresse Oxidativo e Cisplatina | 8 |
| 1.5 Neuroplasticidade | 9 |
| 1.6 Ácido Valproico e neuroproteção | 10 |
| 1.7Relevância e Justificativa | 11 |
| **2. OBJETIVOS** | 12 |
| **3. MATERIAL E MÉTODOS** | 13 |
| 3.1. Animais | 13 |
| 3.2 Drogas | 13 |
| 3.3 Tratamento | 14 |
| 3.3. Modelos comportamentais | 16 |
| 3.3.1. Teste campo aberto | 16 |
| 3.3.2. Teste reconhecimento do objeto novo | 16 |
| 3.3.3. Teste labirinto em Y | 17 |
| 3.5 Estudos neuroquímicos | 17 |
| 3.5.1 Determinação da concentração de glutationa reduzida (GSH) | 18 |
| 3.5.2 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malonildialdeído) | 19 |
| 3.5.3 Método da determinação do conteúdo de nitrito | 19 |
| 3.5.4 Liberação da enzima Mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos humanos | 20 |
| 3.5.5 Determinação da atividade da acetilcolineterase | 21 |
| 3.5.6 Determinação dos níveis de BDNF | 22 |
| 3.5.7 Determinação dos níveis de fosfo-Ser9-GSK3 | 23 |
| 3.5.8 Avaliação de alterações inflamatórias | 24 |
| 3.6 Imunofluorecencia | 25 |
| 3.7 Expressão Gênica de iNOS e AchE por Qpcr | 25 |
| 3.7 Análise estatística | 26 |
| 3.8 Recursos disponíveis | 26 |
| **4 RESULTADOS ESPERADOS** | 27 |
| **5. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO** | 28 |
| **6. ORÇAMENTO** | 29 |
| **7.REFERÊNCIAS** | 30 |

1. **INTRODUÇÃO**
   1. **Cisplatina**

A atividade anticancerígena da cisplatina foi descoberta de forma acidental. Em 1965, Rosenberg e colaboradores5 observaram a ação de complexos de platina sobre a indução do crescimento de filamentos em células bacterianas e verificaram que tais complexos inibiam a divisão celular (OZ et. al, 2015). A partir desta investigação, Rosenberg afirmou que tais complexos poderiam agir de maneira semelhante para inibir a divisão celular em células tumorais (SANTOS, 2008).

Em 1978, a cisplatina foi oficialmente aprovada como agente anti-câncer pela FDA (Food and Drug Adminstration) dos Estados Unidos e liberados para uso médico. Em 1979, a droga foi liberada no Reino Unido e no Canadá e, em seguida, no mundo todo, inclusive no Brasil, com os nomes de neoplatina e platinol. Clinicamente, a cisplatina era mais eficiente quando usada em combinação com outras drogas já conhecidas como a ciclofosfamida, a bleomicina, e a adriamicina, além de outras. Foi a primeira droga anti-tumoral descoberta que continha um metal. A nova droga se mostrou eficiente em tumores de testículos, ovário, endométrio, pescoço, cabeça, bexiga, pulmões, linfomas, mama, esôfago, estômago e leucemia (SANTOS, 2008).

A cisplatina se encontra em lugar de destaque, entre principais compostos utilizados na quimioterapia anticâncer, atualmente. Sua atividade terapêutica é para uma variedade de tumores como os de bexiga, esôfago, vesícula (avançado) e cabeça, sendo entre os agentes oncológicos o mais extensamente usado e eficaz contra o câncer metastático ovariano, metastático testícular e de pescoço, sendo também um importante coadjuvante no tratamento do câncer de pulmão (OZ et. al, 2015; OLIVEIRA, 2013; GOODSELL, 2006).

Embora o mecanismo de ação da cisplatina e da carboplatina seja muito discutido, é amplamente aceito no meio científico que estes dois compostos possuem o mesmo tipo de atuação na inibição do DNA da célula tumoral. A cisplatina e a carboplatina alquilam o DNA. O mecanismo de ação está relacionado com a inibição seletiva da síntese do DNA (CHO et al., 2008; NADIN et al., 2006). A forma ativa da cisplatina faz ligações covalentes com as porções nucleofílicas principalmente da guanina. O principal sítio de atuação é o nitrogênio 7 da guanina (N-7), embora também ocorra ligação covalente com a adenosina e a citosina (RODRIGUES, 2013). As propriedades citotóxicas destes compostos, assim como o de numerosos análogos, têm sido atribuídas à sua habilidade de formar ligações cruzadas (“Cross-Link”) do tipo interfilamentares e também intrafilamentares. Como a cisplatina é bifuncional, ela pode fazer duas ligações com o DNA, que são similares às reações alquilantes; formam-se ligações cruzadas com as fitas ou filamentos do DNA em particular com a guanina e citosina (CHO et al., 2008; NADIN et al., 2006; WOZNIAK, CZECHOWSKA, BLASIAK, 2004).

Na prática clínica, o uso da cisplatina é limitado devido aos seus efeitos adversos como nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, mielossupressão, efeitos gastrintestinais e mutagênese (WEIJL, CLETON, OSANTO, 1997). Estas toxicidades são dose-dependentes, limitando a terapia e a dose máxima tolerada. Para a cisplatina, a dose máxima tolerada está entre 100 e 120 mg/m2 (I.V.) ou entre 2,5 e 3,0 mg/Kg (I.V.) por ciclo e deve ser administrada com pré- e pós-hidratação adequada (HARTMANN, LIPP, 2003; MARKMAN, 2003). A concentração normalmente encontrada no plasma de pacientes tratados com cisplatina é de 35 µM (DIMANCHE-BOITREL et al., 2005). Entretanto, overdoses acidentais de cisplatina podem ocorrer. Embora a reação à quimioterapia seja diferente de paciente para paciente, quase todos os indivíduos que são tratados com cisplatina apresentam problemas gastrintestinais.

* 1. **Cisplatina e déficit cognitivo**

Embora a cisplatina seja muito eficaz na terapia do cancer, ela é extremamente tóxica, e tem efeitos secundários graves, tais como a neurotoxicidade, nefrotoxicidade, ototoxicidade, e vómitos (KHAN et al., 2012; KIM, H. J. et al., 2010; KLEIN). Os efeitos adversos da cisplatina no sistema nervoso foram demonstrados na literatura em animais e seres humanos com o exame eletrofisiológico e histopatológico do nervo periférico (CAROZZI et al 2009;. KRARUP-HANSEN et al 2007; MONJE et al, 2007).

A atividade antitumoral da cisplatina é mediada pela sua interação direta com adutos de DNA que inibem a transcrição genética e a síntese de proteínas que envolve a manutenção dos neurônios. Esta interação induz estresse oxidativo e apoptose no tumor. Tem sido relatado que os roedores tratados com cisplatina apresentam comprometimento motor, deficiências cognitivas e comportamentos anormais devido a alterações do hipocampo e funções do cerebelo (SHABANI, LARIZADEH et. al, 2012; SHABANI, NAZERI, et ai. 2012).

Vários mecanismos patofisiológicos, tais como danos ao DNA, inflamação, disfunção mitocondrial, morte celular apoptótica e o dano oxidativo no sistema nervoso são prováveis mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida por cisplatina, mesmo embora o mecanismo exato de neurotoxicidade relacionada com a platina seja não totalmente esclarecido (ENGLANDER, 2013; GILL & WINDEBANK, 1998).

O potencial para neurotoxicidade causado pela cisplatina, frequentemente observada em pacientes, causa problemas de limites de doses no processo de tratamento (Brouwers et al 2009). Estes efeitos adversos de exposição à cisplatina têm levado à pesquisa de tratamentos preventivos (CAMPBELL et al. 1996, 1999).

Muitos agentes têm sido propostos para gerir a neuropatia induzida por quimioterapia (acetilcisteína, amifostina, cálcio e magnésio, ditiocarbamato de dietilo, glutationa, ou vitamina E), mas os dados são insuficientes para concluir que qualquer um dos agentes previnam ou limitam o neurotoxicidade de drogas de platina em pacientes humanos (ALBERS et al. 2011).

Estudos publicados relatam prejuízos cognitivos em pacientes com câncer recebendo regimes de quimioterapia contendo cisplatina (SCHAGEN et al 2008; GAN et al., 2011).

Mehmet Oz (2015), estudou os efeitos da cúrcuma sobre o déficit cognitivo induzido por cisplatina e demonstrou que em ratos tratados por cisplatina durante 5 semanas consecutivas causou disfunção do sistema colinérgico, aumento dos níveis de MDA e redução da atividade da SOD (superóxido dismutase) no hipocampo e plasma desses animais.

Chtourou et. al (2015), demonstrou também que o tratamento com cisplatina em ratos causou deficiência cognitiva hipocampo dependente, danos oxidativos e redução da função colinérgica.

A falta de tratamentos eficazes para a neurotoxicidade provocada por quimioterapia torna grande a necessidade de estudos sobre fármacos e substâncias alternativas, como os antioxidantes, eficazes no tratamento desses efeitos indesejáveis e limitantes ao tratamento. (SPENCER 2008a, b).

* + 1. **Inflamação, Estresse Oxidativo e Cisplatina**

Evidências apontam que a cisplatina promove processos neuroinflamatórios relacionados a seus efeitos adversos no tratamento de diversos tipos de tumores, podendo levar a um processo neurodegenerativo. Estudos com modelos animais mostraram que ambos os processos estão associados ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, radicais livres e óxido nítrico (NO) no cérebro (CHTOUROU, 2015; OZ, 2015; SANTOS, 2008).

Estresse oxidativo (EO) é um estado celular no qual existe um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade celular de eliminá-las através de mecanismos antioxidantes. As EROs destroem biomoléculas como o DNA, proteínas e lipídios o que pode levar a morte celular ([BIEWENGA et al. 1997](#_ENREF_12)). Pesquisadores constataram que o tratamento com a cisplatina promove um aumento do EO a partir do aumento da peroxidação lipídica e da atividade da superóxido dismutase (SOD), bem como no dano ao DNA ([KULOGLU et al. 2002](#_ENREF_54), [FREY et al. 2007](#_ENREF_24)).

Chtourou et. al (2015), demonstrou que após tratar ratos com cisplatina houve danos oxidativos no hipocampo devido ao aumento dos níveis de MDA, nitrito e da expressão da NOSi. Oz et. al (2015) também descreveu aumento dos níveis de MDA e redução da atividade da SOD em hipocampo de ratos tratados com cisplatina.

* + 1. **Neuroplasticidade**

Plasticidade é a habilidade de sofrer modificações e mantê-las, sendo esta propriedade essencial para o funcionamento apropriado do sistema nervoso. Esta capacidade de sofrer modificações permite ao organismo se adaptar a alterações complexas do meio-ambiente interno e externo, uma propriedade extremamente importante para sobrevivência e reprodução. Todos os fenômenos comportamentais complexos – incluindo regulação do humor e emoção – são dinâmicos e se apoiam em circuitos de plasticidade neural.

Neuroplasticidade é o termo mais amplo que relaciona alterações em cascatas de sinalização intracelular e regulação genética, modificações do número e força das sinapses, variações na liberação de neurotransmissores, modelação na arquitetura axonal e dendrítica e, em algumas áreas do SNC, a geração de novos neurônios ([MCCLUNG and NESTLER 2008](#_ENREF_60)).

Uma das organelas intracelulares envolvida na neuroplasticidade é a mitocôndria. Esta organela tem um importante papel na regulação intracelular de cálcio e citoproteção. A captação do cálcio do citosol e sua liberação têm importantes consequências para a atividade neuronal e glial, modulando respostas intracelulares fisiológicas e fisiopatológicas ([SIMPSON and RUSSELL 1998](#_ENREF_76)) em uma variedade de circuitos neuroanatômicos e regiões que fazem mediação de comportamentos complexos, incluindo aquelas implicadas na fisiopatologia dos transtornos de humor.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um membro da família dos fatores de crescimento denominada genericamente de “neurotrofinas”, cujos efeitos resultam da ativação do seu receptor cognato tirosina-quinase B (Trk B) ([DUMAN 2002](#_ENREF_19)). O BDNF tem influência marcante na eficácia sináptica, na conectividade neuronal e na neuroplasticidade ([POST, 2007](#_ENREF_67)). Esta neurotrofina está expressa no córtex cerebral e no hipocampo, áreas cerebrais que regulam funções cerebrais complexas, como a memória declarativa e a emoção ([GRANDE et al. 2010](#_ENREF_35)). Os níveis de BDNF têm influência sobre o volume hipocampal ([GRANDE et al. 2010](#_ENREF_35)).

Glicogênio sintase quinase-3 β(GSK3β) é uma quinase protéica originalmente identificada e nomeada devido à sua habilidade em fosforilar e inativar a enzima metabólica glicogênio sintase ([EMBI et al. 1980](#_ENREF_21)). Posteriormente, a GSK3β foi identificada como uma enzima capaz de modular diversos aspectos da função neural, como: a plasticidade sináptica, a estrutura neuronal, a expressão gênica e a resiliência neuronal ([DOBLE and WOODGETT 2003](#_ENREF_17), [JOPE and JOHNSON, 2004](#_ENREF_43)). Tal proteína é abundantemente expressa em diversas áreas cerebrais, a saber: hipocampo, córtex cerebral e estriado (YAO et al. 2002).

Diversas moléculas fosforiladas pela GSK podem explicar sua relevância na neuroproteção. Por exemplo, a ativação desta enzima inibe o CREB e a β-catenina (QUEIROZ et al., 2004). Além do mais, a GSK-3 regula diretamente os sistemas neurotransmissores dopaminérgico, glutamatérgico e serotoninérgico ([JOPE e ROH 2006](#_ENREF_44)) e ([BEAULIEU et al. 2009](#_ENREF_6)).

* 1. **Acido Valproico e neuroproteção**

O ácido valproico (VPA) é um ácido graxo de cadeia curta, amplamente prescrito como um medicamento antiepiléptico. A ação farmacológica de VPA no tratamento da epilepsia envolve múltiplos mecanismos, incluindo aqueles associados com a regulação da neurotransmissão GABAérgica, o bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem e modulação da transmissão glutamatérgica, dopaminérgica e serotoninérgica. Pode exercer efeito neuroprotetor contra a excitotoxicidade (CHU et. al, 2015)

Ácido valproico é também utilizado para o tratamento de transtornos de humor, enxaquecas e dor neuropática,( FAGUNDES, 2008), que indica tanto a tolerância e a importância clínica. A diversidade de utilizações poderá ser explicada pelo fato de que o VPA afeta numerosos sistemas.

Em estudos experimentais, devido ao VPA também ter como mecanismo de ação a inibição da histona deacetilase e da GSK3, ele tem demonstrado efeitos neuroprotetores como antiapoptótico, anti-inflamatório e anti-neurotóxico (CHU, ZHOU, LU et. al,2015).

Várias vias de transdução de sinal intracelular são modulados pelo VPA, como resultado da sua ação sobre a regulação das atividades enzimáticas incluindo fosfatidilinositol 3-quinase / Akt-1, proteínas quinases ativadas por mitógenos e GSK3β e histona-desacetilase (JELLINGER, 2011).

Há cada vez mais evidências de que o VPA tem propriedades neuroprotetoras, e em estudos recentes VPA tem demonstrado resultados promissores em vários modelos de lesão aguda (incluindo acidente vascular cerebral, lesão cerebral traumática, e lesão da medula espinal) (CHIU et. al, 2013).

VPA também exerce efeitos neuroprotetores em doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Parkinson e doença de Alzheimer.(XIMENES et. al., 2015; CHEN, 2014; LV, 2011). Chu, Zhou, Lu et. al (2015), demonstrou que VPA teve a capacidade de proteger neurônios motores da morte induzida por estresse oxidativo, como também suprimiu a oxido nítrico sintase induzível (NOSi). O autor cita também que *in vitro*, VPA protegeu células neurais progenitoras submetidas a lesão com peroxido de hidrogênio.

Através da inibição de histona desacetilase, VPA, inibe a produção de mediadores inflamatórios (por exemplo, o TNF-α, IL-β e IL-6), regula positivamente proteínas neuroprotetores (por exemplo, HSP70, HSP27 e pAkt), e regula negativamente fator de p53 associada a apoptose, resultando numa notável preservação de neurónios e os oligodendrócitos, como também aumento das neurotrofinas, como BDNF (CHU, ZHOU, LU et. al,2015).

* 1. **Relevância e justificativa**

A neurotoxicidade causada pelo tratamento com a cisplatina é um evento que merece especial atenção, já que pode causar limitações, podendo provocar atrasos ou interrupção no tratamento, assim resultados inferiores em termos de resposta e sobrevida. Como também, podendo acarretar graves complicações neurológicas, prejuízos cognitivos e motores, demência, convulsão, perda auditiva e visual (FONSECA et. al, 2010).

O prejuízo cognitivo tem consequências diretas na vida do paciente, interferindo nas atividades de vida diária relacionadas à capacidade do indivíduo em executar, de forma independente, as atividades consideradas essenciais à sua sobrevivência e, consequentemente, na manutenção de suas relações sociais, prejudicando, também, o desempenho profissional, causando grandes impactos na sua qualidade de vida.

O estudo do déficit cognitivo relacionado à cisplatina, que é um quimioterápico usado no tratamento de diversos tipos de tumores, torna-se necessário para identificar estratégias de intervenção com o objetivo de minimizar tais efeitos. Para isso, entretanto, é fundamental primeiramente o conhecimento de como a cisplatina poderia interferir na cognição, como também, pesquisar fármacos e substâncias que possam colaborar com um tratamento eficaz para esses efeitos neurotóxicos, já que existem na literatura poucos estudos a respeito do comprometimento neurológico central causado pela cisplatina, como também de um tratamento eficaz para esses eventos. Portanto há uma grande necessidade de novos estudos a respeito de novos tratamentos.

O ácido valproico é um fármaco já utilizado há décadas para tratamento de diversos distúrbios neurológicos (epilepsia, enxaquecas, transtornos de humor e dor neuropática). Atualmente, vários estudos tem demonstrado seus efeitos neuroprotetores em doenças neurodegenerativas (CHU, ZHOU, LU et. al, 2015; XIMENES et. al, 2015; CHEN, 2014;; LV, 2011), e lesões agudas no SNC (CHIU et. al, 2013), portanto é um fármaco promissor para o tratamento da neurotoxicidade causada por cisplatina.

A vitamina E tem efeitos antioxidantes através da redução da produção de radicais livres (ARGIRIOU et. al, 2005). Três estudos fase III randomizados, já evidenciaram efeito neuroprotetor da vitamina E na neuropatia periferíca induzida pela cisplatina, assim como redução da toxicidade neurológica em pacientes que fizeram uso profilático da vitamina E, porém sendo necessário mais estudos que ajudem a evidenciar tal resultado (PACE et. al, 2010; ARGIRIOU et. al, 2005; PACE et. al, 2003). Kim, et al (2016) demonstrou que a vitamina E reduziu a necrose e a apoptose tardia na otoxicidade induzida por cisplatina. Hosseinian et. al (2015), relatou que a vitamina E melhorou os parâmetros bioquimos e da função renal na nefrotoxicidade induzida por cisplatina.

Dentro desse contexto, este estudo tem como objetivo avaliar os domínios da função cognitiva prejudicados em pacientes submetidos à quimioterapia, como também analisar os efeitos do ácido valpróico e da vitamina E sobre a neurotoxicidade induzida por cisplatina.

1. **OBJETIVOS**

**2.1 Objetivo Geral**

**-** Estudar os efeitos do ácido valproico e da vitamina E na toxicidade induzida por cisplatina no sistema nervoso central.

**2.2 Objetivos Específicos**

-Verificar as alterações comportamentais causadas aos animais pela administração de cisplatina e a prevenção e/ou reversão destas pelo uso do ácido valproico e da vitamina E;

-Determinar as alterações em parâmetros de estresse oxidativo como: atividade de SOD, glutationa reduzida, peroxidação lipídica e peroxinitrito no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex temporal;

-Determinar os níveis de acetilcolinesterase no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex temporal;

-Avaliar as alterações em mecanismos de neuroplasticidade como: níveis de BDNF, fosfo-Ser9-GSK3 em animais tratados com ácido valproico na toxicidade induzida por cisplatina;

-Avaliar as alterações inflamatórias e anti-inflamatórias como: IL-1β, TNFα, e IL10 em animais tratados com ácido valproico ou vitamina E na toxicidade induzida por cisplatina.

-Marcar por imunofluorescência os marcadores GFAP e Fosfocreb, NFκB e NeuN no hipocampo, Iba-1e iNOS em animais tratados com ácido valproico ou vitamina E na toxicidade induzida por cisplatina.

-Quantificar por PCR a expressão gênica das enzimas iNOS e AChE em animais tratados com ácido valproico ou vitamina E na toxicidade induzida por cisplatina.

1. **MATERIAIS E MÉTODOS**

**3.1 Animais**

Os experimentos serão realizados em ratos Wistar machos adultos (peso: 250-300 g), obtidos no biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) sempre no mesmo horário, no caso dos experimentos comportamentais entre 10:00 e 16:00. Serão utilizados 8 animais por grupo, sendo os mesmos divididos e mantidos em caixas de acordo com seus respectivos tratamentos, com um ciclo claro/escuro de 12 h, água e ração animal *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais serão realizados de acordo com diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) já tendo sido aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEPA-UFC).

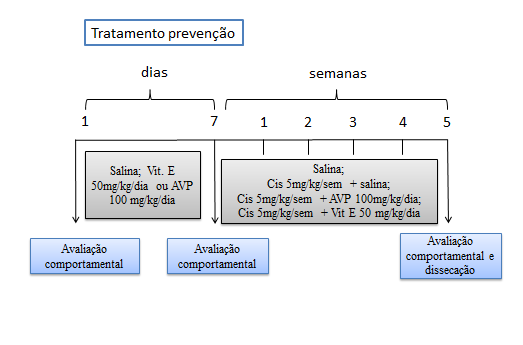
**3.2. Drogas**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Droga** | **Preparo** | **Via de administração** |
| Cisplatina (Platistine®) | Solução injetável | Via intraperitoneal (IP) |
| Ácido Valproico (DEPAKENE®) | Xarope | Via oral |
| Vitamina E | Xarope | Via intraperitoneal |

**3.3 Tratamento**

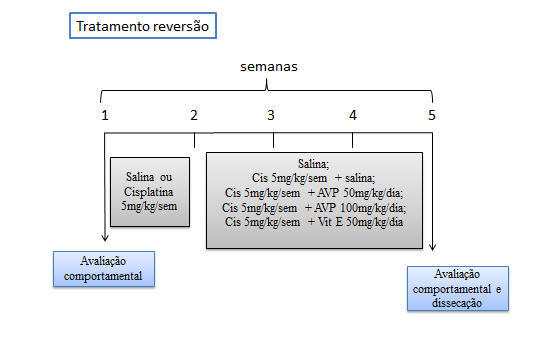
Serão feitos dois tipos de protocolos: prevenção e reversão. No primeiro, será realizado o pré-tratamento com ácido valproico e/ou vitamina E durante sete dias e posteriormente iniciará o tratamento com cisplatina (5mg/kg/semana) durante cinco semanas concomitante com o tratamento com ácido valproico ou vitamina E. No segundo será realizado o tratamento com cisplatina (5mg/kg/semana) durante cinco semanas consecutivas, tratamento no qual induz os sintomas neurotóxicos por cisplatina no cérebro (CHTOUROU et. al, 2015), na segunda semana será iniciado tratamento com ácido valproico e/ou vitamina E. As doses de ácido valproico foram baseadas em estudos anteriores (XIMENES et. al,2015; CHU et.al, 2015) e a dose da vitamina E foi escolhido através da conversão de dose recomendada diária para adultos humanos (REAGAN-SHAW et al, 2007) ) para a dose equivalente em ratos ( ). Cada grupo será constituído por oito animais. Os animais serão tratados conforme o esquema abaixo:

**Figura 1:** Esquema tratamento de prevenção



Fonte: próprio autor

**Figura 2:** esquema de tratamento de reversão

****

Fonte: próprio autor

Os estudos comportamentais serão avaliados 30 minutos antes do início do tratamento com as drogas, no 7º dia (tratamento prevenção) e no último dia de tratamento em ambos os protocolos de tratamento, individualmente 2 h após a última administração, de maneira que o comportamento de cada animal servirá para comparação com ele próprio, desta forma será possível acessar os efeitos do tratamento comparando com o 1º dia de tratamento e se as drogas estão sendo eficazes, caso-a-caso. Os camundongos serão sacrificados por decapitação imediatamente após as determinações comportamentais e as áreas cerebrais serão dissecadas (hipocampo, córtex pré-frontal córtex temporal), rapidamente congeladas e armazenadas a -70° C até a análise bioquímica.

**3.4 Estudo dos efeitos comportamentais**

**3.4.1 Campo Aberto**

O presente experimento é utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). Os animais serão colocados em um campo aberto, com área de 50 x 50 cm. Previamente, serão habituados durante 1 minuto ao campo aberto e, posteriormente, submetidos ao teste durante 5 minutos. O parâmetro para observação será o número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea ou atividade locomotora espontânea/ALE), registrados durante um período de 5 minutos.

**3.4.2 Reconhecimento de objeto novo (NOR)**

O teste de reconhecimento do objeto novo é baseado na avaliação das diferenças de tempo de exploração de objetos novos e familiares. Embora parâmetros como atenção e ansiedade também possam ser avaliados por esse teste (GOULART et al., 2010; SILVERS et al., 2007) , ele tem sido amplamente utilizado para investigação de alterações na memória, sobretudo no que diz respeito à memória de reconhecimento, e para esse fim será utilizado nesse estudo. Além disso, nos deteremos na avaliação da memória de reconhecimento de curta duração.

O teste consiste em três etapas: habituação, familiarização e fase teste executadas de acordo com ENNACEUR E DELACOUR et al.(1988) e adaptadas por Taglialatela et al. (2009), que serão discriminadas a seguir.

Cada animal será, primeiramente, habituado em um arena de campo aberto vazia de dimensões 300 x 300 mm, com paredes 150 mm de altura e feita material acrílico transparente. Essa etapa consistirá de duas sessões de 10 minutos de duração, separadas entre si por um intervalo de 24 horas. Após 24 horas da última sessão de habituação, os animais serão submetidos à fase de familiarização, na qual serão expostos a dois objetos idênticos, denominados de objetos familiares, por tempo suficiente para que tenham todos 20 segundos de exploração desse objeto, após o qual essa fase encerra. Nesse contexto, Ennanceur e Delacour (1988) definiram como exploração o direcionamento do focinho para o objeto a uma distância de 2 cm ou menos dele, como também tocá-lo com o focinho ou cheirá-lo. Depois disso, os animais retornarão para suas caixas moradia e, após um período de 2 minutos, eles retornaram para a arena, na qual dois objetos, um idêntico ao familiar (mas não previamente usado) e outro novo. Assim, será permitido aos animais explorarem o ambiente por 10 minutos, durante o qual a quantidade de tempo explorando cada objeto será registrada. Os objetos familiar e novo serão alternados de posição para cada animal testado, e os objetos e a arena serão limpos com álcool 70-75% entre os ensaios.

Ademais, o índice aferido nesse teste será o percentual de tempo explorando cada objeto (familiar versus novo), reportado como taxa de discriminação de objeto, e será calculado pela seguinte fórmula:

(Tempo explorando o objeto específico/ tempo total usado na fase teste -10 min) x 100

**3.4.3. Y maze**

Para avaliação da memória de trabalho será utilizado o teste de labirinto em Y, sendo conduzido conforme descrito previamente (YAMADA et al., 1996). O labirinto em Y é constituído de três braços idênticos (40 cm de comprimento, 25 cm de altura e 6 cm de largura), dispostos a 120o um do outro, formando um triângulo central (Figura 10). Os animais serão colocados em um dos braços e a sequência das entradas nos braços será registrada durante oito minutos. A alternância será definida como a entrada nos três braços, em qualquer ordem, sem que houvesse repetição dos braços (por exemplo, 123, 321, 231). Após o teste, os animais serão devolvidos às suas caixas-moradia e realizar-se-á a assepsia do labirinto em Y com álcool etílico a 15% entre um animal e outro.

A porcentagem de alternância será calculada como a soma do número de alternâncias dividida pelo número total de entradas nos braços menos dois. Esses valores foram aplicados na fórmula a seguir: % de alternância corretas = soma de alternâncias/nº de entradas totais -2.

**3.5. Estudos neuroquimicos**

* + 1. **Dosagem da superóxido dismutase (SOD)**

A quantidade da enzima superóxido dismutase (SOD) será avaliada medindo-se sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-bluetetrazolio (NBT). Os homogenatos das áreas cerebrais preparados em tampão fosfato, serão misturados em 1 mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8), 150 uL do NBT 75 uL e 300 uL riboflavina 2 uL numa câmara escura. Os tubos contendo a solução obtida serão expostos a lâmpadas fluorescentes (15 W) por 15 minutos. Ao término do tempo o material será lido em espectofotômetro 560nm. Os resultados serão expressos em unidades da enzima, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50 %.

**3.5.2 Determinação da concentração de glutationa reduzida (GSH)**

Os homogenatos das áreas cerebrais serão adicionados a ácido tricloroacético a 50%, agitados e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida o sobrenadante será recolhido e acrescido de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e DTNB 0,01M. Após 1 minuto da reação, a leitura será feita em leitor de placas em 412nm. A concentração de glutationa reduzida será expressa em ng de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

**3.5.3 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malonildialdeído)**

Serão preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. 0,25 mL do homogeneizado será misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 minutos, adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 min). O conteúdo de TBARS será determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados serão expressos em micromol de malonildialdeído (MDA)/g de tecido.

**3.5.4 Determinação dos níveis de nitrito**

A concentração de nitrito será determinada segundo o método de GREEN e colaboradores (1981), que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra (sobrenadante celular, urina, plasma ou homogenato tecidual) por uma reação de diazotação que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorbância de 560 nm. Para esta experiência 100 L do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0.1% / H3PO4 em 1% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) será adicionado a 100 L do sobrenadante da cultura de célula e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão será elaborada com várias concentrações de NaNO2 (variando de 0,75 à 100 M) sob as mesmas condições. Os brancos serão preparados pela adição de 100 L do reativo de Griess a 100 L do meio de cultura e a absorbância será medida em leitor de microplacas em 560 nm.

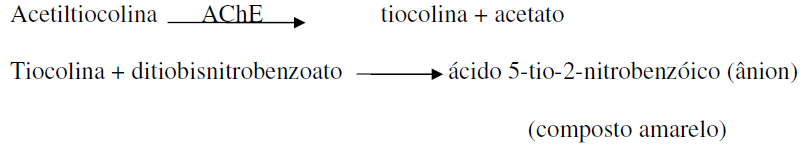
**3.5.5 Liberação da enzima Mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos humanos**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima contida nos grânulos primários dos neutrófilos. Mais de 95% da MPO está presente nos grânulos dos neutrófilos, existindo os restantes 5% nos monócitos circulantes. Esta enzima catalisa a oxidação de substâncias na presença de peróxido de hidrogênio (H2O2) e de um halogênio, constituindo a ligação peróxido de hidrogênio-halogênio-MPO um sistema altamente tóxico para os microorganismos. Segundo Lucisano e Mantovani (1984), 2.5 x 106 de leucócitos humanos, obtidos segundo descrição no item anterior, foram suspensos e tamponados com solução balanceada de Hanks, contendo cálcio e magnésio. As preparações continham predominantemente neutrófilos (85.0 ± 2.8%) e a viabilidade das células foi determinada pelo Teste de Trypan azul, 97.7 ± 0.94%. As células foram incubadas com os óleos essenciais (0.01, 0.1 e 1 µg/ml) por 15 minutos numa temperatura de 37ºC. Os neutrófilos humanos foram estimulados pela adição de acetato de miristato de forbol (PMA, 0.1 µg/mL) por 15 minutos numa temperatura de 37ºC. A suspensão foi centrifugada por 10 min, 2.000 g em 4ºC. Alíquotas (50 µL) do sobrenadante foram adicionadas a salina tampão-fosfato (100 µL), tampão-fosfato (50 µL, pH 7.0) e H2O2 (0.012%). Após 5 minutos numa temperatura de 37ºC, tetrametil benzidina (1.5 mM, 20 µL) foi adicionado e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio (1.5 M, pH 3.0). A absorbância foi determinada em 620 nm.

**3.5.6 Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade acetilcolinesterásica (AChE) será determinada a 25 ºC e pH 8,0, de acordo com o método de Ellman *et al.,* (1961), que tem como princípio a medida da velocidade de produção da tiocolina à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5’-ditio-bis-2 nitrobenzoato (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2 nitrobenzóico (II).

A atividade enzimática será medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante, pelo menos, 10 minutos (ALLES; HAWES, 1953). As leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 412 nm, através de um espectrofotômetro (*Beckman* DU acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA ou *Beckman*, modelo DU 640B, CA, USA) que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade (leitura em décimos de milésimos de absorbância). A atividade específica foi expressa em nmoles de ATC hidrolisados por miligrama de proteína por minuto.



As soluções utilizadas neste teste:

- Solução de ácido 5:5’-dito- bis-2 nitrobenzoato, DTNB (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 mM em tampão de sódio;

- Solução de iodeto de acetilicolina, ATC (Sigma, Sr. Louis, MO, USA) 75 mM em água bidestilada; Tampão de Fosfato de Sódio: NaH2OPO4.H2O, 0,1 mM em água bidestilada, pH 7.0.

Os tecidos serão homogeneizados em tampão fosfato 10% e o homogenato (5 µL) será adicionado a uma cubeta contendo 500 µL do tampão, 895 µl de água destilada e 50 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M e a absorbância zerada.

Após a absorbância ser deixada em zero, a cubeta é retirada e acrescentado 50µL de iodeto de acetiotiocolina (ATC) (QUADRO 3). Absorbância será registrada por 3 min, em 412 nM. A atividade da enzima será calculada como modificações na absorbância do minuto 3 para o minuto 0, relativo ao conteúdo de proteína contido no homogenato (LOWRY *et al*., 1951).

**3.5.7 Dosagem de Proteína**

O método é baseado na interação do corante *Coomassie Blue* G250 (BG250) e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595nm.

A Solução Mãe de *Coomassie Blue* G250 será diluída 5x com H2O destilada antes de ser usada e permanecerá na geladeira por, no máximo, uma semana (Ex.: 1mL da solução mãe + 4mL de água destilada) - SOLUÇÃO DE *BRADFORD* Adicionar-se-ão as soluções (albumina padrão, água destilada, tampão e amostras) aos poços.

Em cada poço será adicionado 40µL de solução. Por exemplo, se no poço forem adicionados 2µL da amostra, também serão adicionados 38µL do tampão utilizado no preparo da amostra.

Albumina em concentrações crescentes (EM DUPLICATA para fazer a curva padrão) Amostras (tampão utilizado para o homogenato e em seguida será acrescentado às amostras: o volume final deve ser de 40µL). Branco – 2 poços somente com o homogenato utilizado. Após preencher a placa, serão adicionados 200 µl da solução de bradford (diluída) em cada poço. A leitura será realizada 5 minutos, em comprimento de onda de 595nm(BRADFOR, 1976).

**3.5.8 Determinação dos níveis de BDNF**

Após homogeneização das áreas cerebrais a 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 adicionado de inibidores de protease (Sigma-Aldrich), o nível de BDNF de cada amostra será quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados serão expressos como picograma de BDNF/ mg de proteína total determinada pelo método de Lowry (1951).

**3.5.9 Determinação dos níveis de fosfo-Ser9-GSK3**

Após homogeneização das áreas cerebrais a 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 adicionado de inibidores de protease (Sigma-Aldrich), os níveis de fosfo-GSK-3β de cada amostra serão quantificados por ensaio imunoenzimático (Human/Mouse/Rat Phospho-GSK-3β (S9) ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados serão expressos como picograma de GSK-3 beta/ mg de proteína total determinada pelo método de Lowry (1951).

**3.5.10 Avaliação de alterações inflamatórias**

Os níveis da citocinas pró-inflamatórias, IL-1β, TNFα e citocina antiiflamtória IL10 e TGFβ serão determinados por técnica de ensaio imunossorvente ligado a enzima (Elisa) coulorimétricos de acordo com as instruções do fabricante R&D systems.

A detecção do fator nuclear NFkB será realizada também por técnica de Elisa através de kit coulorimétrico adquirido da Merck Millipore (NFκB p50/p65 EZ-TFA Transcription Factor Assay (Colorimetric)). Vale salientar que este fator é importante na regulação de processos celulares e fisiológicos, tais como: crescimento celular, apoptose, resposta imune e inflamatória, dentre outros.

### 3.6 Imunofluorescência

A imunofluorescência será realizada com a finalidade de obter dados quantitativos da marcação dupla de GFAP e Fosfocreb, NFκB e NeuN no hipocampo.

Após a remoção da área cerebral, a mesma será isolada, separada e fixada em formol tamponado a 10% por 24 horas, seguidas de trocas de sacarose a 30% por 72 horas. Os tecidos serão crioarmazenados em *tissue tek* e guardados no -80 C até o corte no micrótomo, obtendo-se espessuras de 4µm que serão recolhidos e aderidos em lâminas de vidro histológicas silanizadas. Será realizada a recuperação antigênica, com a finalidade de expor os epítopos, onde as lâminas serão mergulhadas em tampão citrato (pH= 6,0) por 20 min no banho Maria à 99ºC. Em seguida, as lâminas serão lavadas duas vezes, três minutos cada, com PBS 1%. Na etapa seguinte, as lâminas serão lavadas três vezes com PBS por 5 minutos cada lavagem, e em seguida seá realizada a permeabilização por 10 min com PBS/0,2% triton-X-100. Na etapa seguinte, realizar-se-á o bloqueio dos cortes para reduzir as marcações inespecíficas com solução de bloqueio (780μL de PBS/1% triton-X-100, 20μL de soro de cavalo e 200 μL BSA 5%). Após o bloqueio, os cortes cerebrais serão incubados com os anticorpos primários anti-GFAP (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-6170, 1:100), , anti-iNOS (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-8310, 1:100), anti-Iba-1 (Abcam, ab107159, 1:50), ou anti-NFκB NLS (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-114, 1:200), diluídos em BSA 1%, *overnight* a 4°C em câmara úmida para evitar o ressecamento dos cortes. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários serão omitidos. Na etapa seguinte, será efetuado a lavagem dos cortes com PBS por cinco minutos e será incubado com os anticorpos secundários Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit (Invitrogen, A21206, 1:500), Alexa fluor 594 donkey anti-mouse (Invitrogen, A21203, 1:400) e Alexa fluor 594 donkey anti-goat (Invitrogen). Após a remoção do anticorpo secundário e lavagem com PBS por 4 vezes de 5 minutos cada, aplicar-se-á, por 7 min, DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol, Invitrogen) para a marcação nuclear. Por fim, as lâminas serão lavadas com PBS por 4 vezes durante 5 min cada, secadas e aplicado o Fluoromaut (DAKO) para inserir a lamínula.

As imagens serão adquiridas e quantificadas por meio de um microscópio Cytation ( USA) usando uma objetiva de 40x/NA 1,4 .

### 3.7 Expressão Gênica de iNOS e AchE por qPCR.

### 3.7.1 Preparação das amostras

Os fragmentos de hipocampo dos animais serão retirados e macerados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os fragmentos macerados serão adicionados em microtubo com 100μL de tampão de lise (Promega, EUA). Em seguida, serão armazenados no freezer a -80ºC até sua utilização para extração do RNA.

### 3.7.2 Extração do RNA

O RNA total de cada amostra será isolado usando kit de extração de RNA (Promega). Resumidamente, as amostras com tampão de lise serão misturadas cinco vezes por inversão. Será adicionado às amostras 350 μL de tampão de diluição do RNA, sendo homogeneizadas quatro vezes por inversão. Em seguida, as amostras serão aquecidas por três minutos a 70°C, com o objetivo de romper as ligações dos ácidos nucléicos, e centrifugadas por 10 min. O sobrenadante será transferido para um microtubo. Adicionar-se-á 200 μL de etanol a 95%. Na fase seguinte, a mistura será transferida para *spin basket* acoplado a um microtubo coletor de 2 mL e centrifugado a 11200 RPM por um minuto. Adicionar-se-á 600 μL de solução de lavagem e em seguida os tubos serão centrifugados por 11200 RPM por um minuto. Na etapa seguinte, as amostras serão tratadas com DNase para reduzir a contaminação com o DNA, sendo incubadas em temperatura ambiente por 15 min. Decorrido este tempo, 200 μL de DNase *stop solution* serão adicionados e as amostras serão centrifugadas por 1 min a 11200 RPM. Logo em seguida, será inserido tampão de lavagem e as amostras serão centrifugadas, conforme relatado anteriormente. Será adicionado 250 μL de tampão de lavagem seguida de centrifugação por 2 min em 11200 RPM. Na etapa seguinte, o *spin* será inserido em novo microtubo de 1,5 mL, 40 μL de H2O livre de nuclease serão adicionados e os microtubos serão centrifugados por 1 minuto. Por fim, o *spin basket* será descartado e o RNA será extraído e armazenado no freezer -70°C.

Após a extração do RNA de cada amostra, será efetuado a sua quantificação, com 1μL de RNA de cada amostra, utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA). Concomitante a dosagem em ng/μL, realizar-se-á a avaliação da qualidade do RNA extraído, a qual será obtida por meio da relação 260/280, fornecida pelo programa relacionado ao aparelho. A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é de extrema importância para a obtenção da quantidade de amostra adequada para realização da próxima etapa, a saber: síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

### 3.7.3 Síntese do cDNA

O cDNA será sintetizado de acordo com o High capacity cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA). O volume final de cada amostra será de 20μL: 2 µL do reagente 10x tampão da enzima; 0,8 µL de oligonucleotídeos; 2 µL de primer; 1 µL da enzima transcriptase reversa; 1ng de RNA, onde o volume utilizado em µL será dependente da concentração inicial extraída; H2O de nucleases para completar 20 µL. O protocolo da reação será realizado a 25º C por 10 min, 37º C por 120 min, 85º C por 5 min. O cDNA será armazenado em freezer a -20º C até a sua utilização no qPCR.

### 3.7.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão gênica de iNOS e de AchE será avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (Light cycler 96, Roche), utilizando kit de TaqMan PCR master mix (Life Technologies). O gene de referência utilizado será o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Todas as sondas utilizadas e as condições do qPCR estão apresentadas no quadro 1.

Os valores de *Threshold cycle* (Cq ou Ct), obtidos pelo software do equipamento, dos genes avaliados serão exportados para o Microsoft Office Excel 2010, no qual os níveis relativos de RNAm serão calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

|  |  |
| --- | --- |
| iNOS (Óxido nítrico sintase induzida) | |
| ID assay | Mm00440502\_m1 |
| TaQman probe | GCCTTGTGTCAGCCCTCAGAGTACA |
| Amplicon length: | 66 |
| GAPDH (Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase) | |
| ID assay | Mm99999915\_g1 |
| TaQman probe | GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG |
| Amplicon length: | 109 |
| AchE (acetilcolinesterase) |  |
|  |  |
| ID assay | Mm00440502\_m1 |
| TaQman probe | CCTGTGCGGGCAAAATTGCTGGATCCCT CGCTGAA |
| Amplicon length: | 66 |

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.8 Western Blotting

Inicialmente, será preparado 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95ºC, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4ºC, 30s). Em seguida, será realizado a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde será utilizado gel a 10% (caspase 3 e β-catenina) ou e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, será efetuado a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas serão bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, será realizado a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas serão incubadas, overnight a 4ºC sob agitação constante, com os anticorpos anti-caspase 3 e β-catenina) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, será realizado três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas serão incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:1000) ou HRP-rabbit anti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas serão lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionar-se-á o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, *Clarity western ECL blotting substrate*) e as membranas serão agitadas por 5 min. As imagens das bandas serão capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) .A densidade das bandas será mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

**3.9 Análise estatística**

Será utilizada ANOVA e teste de Student Newman Keuls para os testes paramétricos. O programa de computador será o GraphPad Prism 5.0. O critério de significância será p< 0,05.

1. **RESULTADOS ESPERADOS**

* Contribuição para um tratamento e/ou prevenção eficazes na neurotoxicidade induzida por cisplatina e com isso minimizar o sofrimento dos pacientes que fazem tratamento quimioterápico com a cisplatina;
* Publicação de pelo menos 2 trabalhos em periódicos de circulação internacional;
* Apresentação de resumos em encontros científicos
* Fortalecimento da linha de pesquisa em estudos sobre a neurotoxicidade por cisplatina.

1. **CRONOGRAMA**

|  |  |
| --- | --- |
| **Período** | **Atividade a ser desenvolvida** |
| Agosto a dez de 2016 | Otimização dos métodos; revisão de literatura; submissão do projeto ao comitê de ética; desenvolvimento da primeira parte do projeto – desenvolvimento do modelo de estadiamento. Testes piloto de comportamento; |
| Janeiro a julho de 2017 | Tratamento dos animais; otimização dos testes comportamentais; dissecação das áreas cerebrais para determinação dos parâmetros de estresse oxidativo e defesa antioxidante. |
| Agosto a dez de 2017 | Continuação dos experimentos comportamentais; Dissecação das áreas cerebrais para a dosagem de BDNF. Análise estatística parcial dos dados. Envio de manuscrito, com os resultados parciais, para revistas internacionais. |
| Janeiro a julho de 2018 | Determinação dos níveis de fosfo-Ser9-GSK3β; Aplicação dos testes Estatísticos; Análise estatística dos dados. participação em eventos científicos. |
| Agosto a dez de 2018 | Determinação dos parâmetros inflamatórios. Análise estatística parcial dos dados. Envio de manuscrito, com os resultados parciais, para revistas internacionais. |
| Janeiro a julho de 2019 | Realização dos testes de imunofluorescencia e PCR. |
| Agosto a dez de 2019 | Análise estatística final dos dados, participação em eventos científicos, revisão de literatura. |
| Janeiro a julho de 2020 | Análise final dos dados, revisão de literatura, elaboração do relatório final e defesa da tese. |

1. **ORÇAMENTO**

É importante salientar que o orçamento previsto no projeto usará recursos do laboratório de neurofarmacologia e colaborações.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Código** | **Substância** | **Valor** |
| D8130 | 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) | 156,00 |
| G4251-50G | Gluationa redutase | 727,00 |
| N6876-500MG | Nitro tetrazolio (NBT) | 569,00 |
| R4500-100G | Riboflavina | 331,00 |
| H9151-250G | Hexadeciltrimetilamonio (HTAB) | 749,00 |
| D3202-25G | Hidrocloreto de orto dianisidine | 745,00 |
|  | Anticorpos anti- TNFα, anti-IL-1β, ani- iNOS | 2.148,00 (cada) |
| 10296010 | Trizol Reagente-100Ml | 756,32 |
|  | Primers 10 UMOL 10 UMOL | 90,00 (cada) |
| Q32852 | QUANT-IT RNA ASSAY KIT 100 assays 1 KIT | 375,49 |
| 12091021 | RNASE A 10ml | 528,96 |
| 11735032 | SYBR 1-STEP QRT-PCR KIT 100 REAÇÕES | 1.540,00 |
| 15576028 | EDTA 500g | 387,44 |
| 11733038 | PLAT SYBR QPCR 100 REAÇÕES | 580,32 |
| 10928034 | SS ONE STEP RT-PCR WITH PLATINUM TAQ 100 REAÇÕES | 3.368,04 |
| 11615010 | TAQ POLIMERASE BRASIL 500 UNID | 255,72 |
| 18427088 | 10 MM DNTP MIX 1 ml | 2.459,73 |
| 10966030 | PLATINUM TAQ DNA POLYMERASE - BRASIL 500 UNID | 357,99 |
| 18418012 | OLIGO (DT)12-18 PRIMER 25 µg | 435,00 |
| 18080044 | SUPERSCRIPT III REV TRANSCRIPT 10,000 UNID | 1.183,20 |

**REFERÊNCIAS**

## AFONSECA SO, SILVA MAC, GIGLIO A. Abordagem da neuropatia periférica induzida por quimioterapia. Revista Brasileira de Medicina. V67: 20-25, 2010.

ALBERS JW, CHAUDHRY V, CAVALETTI G, DONEHOWER RC. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. Cochrane Database Syst Rev 2:1–49, 2011.

BEAULIEU JM, GAINETDINOV RR, CARON MG. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 49:327-347, 2009.

BIEWENGA GP, HAENEN GR, BAST A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. Gen. **Pharmacol** 29:315-331, 1997.

CAROZZI V, CHIORAZZI A, CANTA A. Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel linar at model of peripheral neurotoxicity. **Eur J Cancer** 45:656–665, 2009.

CHEN S, WU H, KLEBE D, HONG Y, ZHANG J.Valproic acid: a new candidate of therapeutic application for the acute central nervous system injuries. **Neurochem. Res**. 39(9), 1621–1633,2014.

CHO, J.-M.; MANANDHAR, S.; LEE, H.-R.; PARK, H.-M.; KWAK, M.-K. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. Cancer Lett., v.260, n.1-2, p.96-108, 2008.

COLLINS.

CHU T, HENGXING Z, LU L, KONG X, WANG T, PAN B, FENG S. Valproic acid-mediated neuroprotection and neurogenesis after spinal cord injury: from mechanism to clinical potential. **Regen. Med**. V 10: 2, 2015.

CHTOUROU Y, GARGOURI B, KEBIECHE M, FETOUI H. Naringin Abrogates Cisplatin-Induced Cognitive Deficits and Cholinergic Dysfunction Through the Down-Regulation of AChE Expression and iNOS Signaling Pathways in Hippocampus of Aged Rats. **J Mol Neurosci**. V. 56:349–362, 2015.

CHIU CT, WANG Z, HUNSBERGER JG, CHUANG DM. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. **Pharmacol. Rev.** 65(1), 105–142, 2013.

ENGLANDER, E. W. DNA damage response in peripheral nervous system: Coping with cancer therapy-induced DNA lesions. **DNA Repair**, 12 (8), 685–690, 2013.

FAGUNDES S.B.R. Valproic Acid: Review. **Rev.Neurocienc**; 16/2:130-136. 2008.

GILL, J. S., & WINDEBANK, A. J. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. **Journal of Clinical Investigation**, 101(12), 2842–2850, 1998.

GOODSELL, D. S. The molecular perspective: cisplatin. **Oncologist.** 11:316-317, 2006.

GRANDE I, FRIES GR, KUNZ M, KAPCZINSKI F. The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder**. Psychiatry Investig** 7:243-250, 2010.

HARTMAN RE, SHAH A, FAGAN AM et al.Pomegranate juicedecreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer’s disease. **Neurobiol** Dis 24:506–515, 2006.

HOSSEINIAN S; RAD A.K; MOUSA AL REZA H; MOHAMADIAN N; HAVAKHAH S; SHAFIEE S. The protective effect of Nigella sativa against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **AJP**, Vol. 6, No. 1, Jan-Feb 2016.

KHAN, R., et al. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 258, n. 3, p. 315-329, 2012.

KIM, D. H., et al. SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 301, p53, n. 2, p. F427-435, 2011.

KIM, H. J., et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. J Neurosci, v. 30, n. 11, p. 3933-3946, 2010.

LV L, SUN Y, HAN X, XU CC, TANG YP, DONG Q. Valproic acid improves outcome after rodent spinal cord injury: potential roles of histone deacetylase inhibition. **Brain Res.**1396, 60–68, 2011.

MARKMAN M. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: underreported and underappreciated. **Curr Pain Headache** Rep 10: 275–278, 2006.

MCCLUNG CA, NESTLER EJ. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. **Neuropsychopharmacology** 33:3-17, 2008.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; DRAGO, G.; IBARRA, J.; CIOCCA, D.R. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from health individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Lett**., v.239, n.1, p.84-97, 2006.

## OLIVEIRA KA. Modulação do sistema glutamatérgico por cisplatina em células de glioma humano e astrócitos corticais de ratos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Neurociências. Florianópolis, 2013.

OZ M, Atalik E.N, Yerlikaya F.H, , Enver A D. Curcumin alleviates cisplatin-induced learning and memory impairments**. Neurobiology of Learning and Memory** 123:43–49, 2015.

QUEIROZ JA, GRAY NA, KATO T, MANJI HK. Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. Neuropsychopharmacology 33:2551-2565, 2008.

REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD M. Dose translation from animal to human studies revisited. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA. **The FASEB Journal**. Vol. 22. Março, 2007.

RODRIGUES M.A.C. Avaliação da interferência do efeito antioxidante do carvedilol, um potencial agente nefroprotetor, na atividade antitumoral da cisplatina. Tese doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2013.

SANTOS GC. Avaliação do efeito protetor do urucum e da bixina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina em células da linhagem PC12. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2008.

SPENCER JPE. Flavonoids: modulators of brain function? **BrJNutr.** 99: ES60–ES77, 2008a.

SPENCER JPE. Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. **Proc Nutr Soc** 67:238–252, 2008b.

XIMENES J.C.M; NEVES K.R.T; .LEAL L..A.M.;CARMO M.R.S; BRITO G.A.C; NAFFAH-MAZZACORATTI M.G; CAVALHEIRO E.A; VIANA G.S.B. Valproic Acid Neuroprotection in the 6-OHDA Model of Parkinson’s Disease Is Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and HDAC Inhibitory Properties. **Journal of Neurodegenerative Diseases**, 2015.