

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**

**SOPHIA SARAIVA DE SOUZA**

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTIOXIDANTE DA AMANTADINA EM  
MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELA VINCRISTINA EM  
RATOS.**

**ILHÉUS – BAHIA  
2020**

**SOPHIA SARAIVA DE SOUZA**

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTIOXIDANTE DA AMANTADINA EM  
MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELA VINCRISTINA EM  
RATOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual  
de Santa Cruz, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Profº Dr. Mário Sérgio Lima de Lavor

S729 Souza, Sophia Saraiva de.  
Efeitos antinociceptivos e antioxidante da amantadina em modelo de neuropatia periférica induzida pela vincristina em ratos / Sophia Saraiva de Souza. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.  
39 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Lima de Lavor.  
Dissertação (mestrado) –Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.  
Referências: f. 35-39.

1. Ratos. 2. Neuropatia. 3. Antioxidantes. 4. Vincristina. I. Título.

CDD 599.35

**ILHÉUS – BAHIA  
2020  
SOPHIA SARAIVA DE SOUZA**

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTIOXIDANTE DA  
AMANTADINA EM MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELA  
VINCRISTINA EM RATOS.**

Ilhéus – BA, 27/02/2020

---

Mário Sérgio Lima de Lavor – Dsc  
UESC /DCAA  
(Orientador)

---

Renata Santiago Alberto Carlos – Dsc  
UESC

---

Deusdete Conceição Gomes Junior– Dsc  
UFOB

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Lucia e Gorgonio, pelo apoio e confiança em todas as minhas decisões e por sempre estarem ao meu lado, possibilitando a realização desse trabalho. Obrigada pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu irmão, Thomaz, minha cunhada, Fernanda e sobrinha, Isabel. Que mesmo de muito longe, sinto que sou amada e apoiada.

Aos meus tios, que sempre me deram forças para continuar, em especial a minha Tia Mara, minha segunda mãe e madrinha e Tia Angélica, minha companheira e que ainda acolheu meu filho como se fosse dela, não tenho palavras para agradecer.

Aos meus primos, em especial a Tarsila que não sabe, mas me ajudou muito na minha mudança dando apoio em uma cidade estranha. À Lisa, Elis e Marquinhos por aguentarem Gilberto nesse processo.

Às minhas amigas da vida, Andreia e Lais, por todo o amor e mesmo de longe sempre me apoiando.

Ao meu orientador, Mário Lavor, por sua orientação e paciência. Exemplo de profissional que terei como base.

Ao Professor Juneo Freitas Silva pelo acompanhamento na imunohistoquímica e dedicação ao ensinar.

À Janaina, pelos ensinamentos e aos IC e colega de mestrado, Claire, Larissa e João.

Ao pessoal do CBG, em especial ao professor Carlo Priminho Pirovani, pelas orientações e paciência ao ensinar, e por ter disponibilizado seu laboratório e o tempo e conhecimento de suas alunas, Ariana e Thainara, sempre disponíveis e atenciosas. A Adriana, por ceder seu laboratório e equipamentos.

Aos meus amigos que fiz no mestrado, Rebeca, Carolina e Valclei, sem vocês seria muito mais difícil esse processo.

À galera da imuno, Larissa, Luciano e Raquel, pelo companheirismo nas horas a fio de laboratório, boa grupo!

A Universidade Estadual de Santa Cruz, em especial ao hospital veterinário e o programa de pós-graduação em ciência animal (PPGCA), pela oportunidade de aprendizagem.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao apoio financeiro do CNPQ, FAPESB e CAPES.

## **EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTIOXIDANTE DA AMANTADINA EM MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA INDUZIDA PELA VINCRISTINA EM RATOS.RESUMO**

Amantadina é um antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA amplamente utilizada no tratamento do Parkinson e como antiviral, com possível efeito analgésico em algumas enfermidades. Estudos recentes demonstraram que esse fármaco inibe a neuroinflamação, exercendo uma função de neuroproteção. Objetivou-se avaliar os efeitos antinociceptivo e antioxidante da amantadina em ratos após indução de dor neuropática periférica com sulfato de vincristina. Foram utilizados 64 ratos igualmente divididos em oito grupos (n=8): G1: Os animais não receberão nenhum fármaco (Naive), G2: Animais receberam 0,2ml de solução salina via IP, G3: Animais receberam vincristina (0,05mg/kg/IP), G4, G5, G6, G7 e G8: Animais receberam vincristina (0,05mg/kg/IP) e uma hora depois, receberam amantadina nas doses 25, 50, 75, 100 e 125mg/kg/VO, respectivamente, uma vez ao dia, durante oito dias consecutivos. Após o tratamento os animais foram eutanasiados com sobredose de propofol 150mg/kg, via intravenosa, logo após foi coletado 9mm da medula espinal. Foi utilizado o analgesímetro digital para avaliação do limiar nociceptivo mecânico na superfície plantar do pé direito. Através da amostra colhida, a função antioxidante das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foi analisada por meio da mensuração da reação enzimática e imunohistoquímica. Os resultados foram submetidos ao teste *Bartlett's*, os dados, então, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni para comparação das médias e para as variáveis sem distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ( $P<0,05$ ). Foi visto que a dor neuropática foi instituída com a administração do sulfato de vincristina como o protocolo mencionado e a amantadina aumentou significativamente o limiar mecânico dos animais, porém sem diferença entre as doses utilizadas. Em relação à atividade da CAT e SOD, a amantadina não interferiu na ativação de CAT e SOD. Conclui-se que a amantadina teve efeito inibidor da neuropatia periférica, porém seu efeito neuroprotetor não age pelas vias de antioxidativas da catalase e da superóxido dismutase.

**Palavras-chave:** Neuropatia periférica, Vincristina, receptor NMDA, alodinia

## **ANTINOCICEPTIVE AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF AMANTADINE IN MODEL OF PERIPHERAL NEUROPATHY INDUCED BY VINCRIStINE IN RATS.**

### **ABSTRACT**

Amantadine is a non-competitive antagonist of NMDA-type glutamatergic receptors widely used in the treatment of Parkinson's and as an antiviral, with possible analgesic effect in some diseases. Recent studies have shown that this drug inhibits neuroinflammation, exercising a function of neuroprotection. The objective was to evaluate the antinociceptive and antioxidant effects of amantadine in rats after induction of peripheral neuropathic pain with vincristine sulfate. 64 rats were equally divided into eight groups: G1: Animals will not receive any drugs (Naive), G2: Animals received 0.2 ml of saline via IP, G3: Animals received vincristine (0.05mg / kg / IP), G4, G5, G6, G7 and G8: Animals received vincristine (0.05mg / kg / IP) and one hour later, received amantadine in doses 25, 50, 75, 100 and 125mg / kg / VO, respectively, for eight days . After treatment, the animals were euthanized with an overdose of propofol 150mg / kg, intravenously, just after 9mm of the spinal cord was collected. A digital analgesometer was used to assess the mechanical nociceptive threshold. Through the collected sample, the antioxidant function of the enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) was analyzed by measuring the enzymatic and immunohistochemical reaction. The results were submitted to the Bartlett's test, the data were then subjected to analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni test to compare the means and for the variables without normal distribution, the Kruskal-Wallis test ( $P < 0, 05$ ). It was seen that neuropathic pain was instituted with the administration of vincristine sulfate as the aforementioned protocolo and amantadine significantly increased the mechanical threshold of the animals, but without difference between the doses used. Regarding the activity of CAT and SOD, amantadine did not interfere with the activation of CAT and SOD. It is concluded that amantadine had an inhibitory effect on peripheral neuropathy, but its neuroprotective effect does not act through the SOD AND CAT pathways.

**Keywords:** Peripheral neuropathy, vincristine, NMDA receptor, allodynia

### **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1** - Curva dose resposta da amantadina. Média e erro padrão médio da resposta do limiar mecânico (g) nos ratos submetidos a dor neuropática quimioterápica periférica em todos os grupos avaliados (A) e os grupos controle em relação aos grupos Amantadina 25 e 50 mg/kg (B e C, respectivamente) . Símbolos diferentes expressam significância estatística, diferença entre grupo controle positivo e grupo tratado amantadina 25 e 50 (\*), diferença entre grupo controle negativo e positivo (#) (\* e #  $p < 0,05$ ).. .....25
- Figura 2** - Curva dose resposta da amantadina. Média e erro padrão médio da resposta do limiar mecânico (g) nos ratos submetidos a dor neuropática quimioterápica periférica. Grupos controle positivo e negativo em relação os grupos Amantadina 75, 100 e 125 mg/kg (A, B e C, respectivamente). Símbolos diferentes expressam significância estatística, diferença entre grupo controle positivo e grupo tratado amantadina 75, 100 e 125 (\*) \*  $p < 0,05$ .. .....26
- Figura 3** - Média e erro padrão médio da SOD em ratos (n=8), administração de solução salina (controle negativo), administração de vincristina (controle positivo) e as duas doses de amantadina 25 e 50mg/kg. (\*\* $p < 0,05$ ).....27
- Figura 4** - Média e erro padrão médio da CAT em ratos (n=8), administração de solução salina (controle negativo), administração de vincristina (controle positivo) e as duas doses de amantadina 25 e 50mg/kg. ....28
- Figura 5** - Expressão de CAT no corno dorsal da medula espinal dos ratos submetidos neuropatia quimioterápica e administração de solução salina (n=8) A, B, C e D: Imagens imunoistoquímicas da baixa expressão de CAT (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 40 $\mu$ m) E: Aumento da área de expressão da CAT nos grupos controle positivo, amantadina 25 e 50 no citoplasma dos neurônios e substancia branca em comparação ao grupo controle negativo (\* $p < 0,05$ ).....29
- Figura 6** - Expressão de SOD no corno dorsal da medula espinal dos ratos submetidos neuropatia quimioterápica e administração de solução salina (n=8) A, B, C e D: Imagens imunoistoquímicas da baixa expressão de

SOD (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 40µm) E: Aumento da área de expressão da SOD nos grupos controle positivo, amantadina 25 e 50 no citoplasma dos neurônios e substancia branca em comparação ao grupo controle negativo (\*\*p<0,05).....30

## LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SIMBOLOS

5-HT	5-hidroxitriptamina
$\mu\text{L}$	Microlitro(s)
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ATP	Adenosina trifosfato
$\text{Ca}^{2+}$	Cálcio
CAM	Concentração alveolar mínima
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCP	Grupo controle positivo
GCRP	Proteína relacionada ao gene da calcitonina
GPx	Glutathione peroxidase
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrogênio
IASP	International Association for the Study of Pain
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de Sódio
NK1	Receptor de neurocinina 1
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
RPM	Rotação por minuto

SC	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
TFK	Tampão fosfato de potássio
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos .....	13
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1. Fisiologia da dor .....	14
3.2. Dor neuropática .....	15
3.3. Dor neuropática induzida por quimioterápico .....	17
3.4. Amantadina .....	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
4.1.1. Animais e condições de alojamento .....	20
4.1.2. Modelo de dor e grupos experimentais .....	20
4.1.3. Avaliação do limiar nociceptivo mecânico, obtenção das amostras e eutanásia dos animais .....	21
4.1.4. Avaliação do estresse oxidativo .....	22
4.1.5. Imunohistoquímica .....	23
4.1.6. Análise estatística.....	23
<b>5. RESULTADOS</b> .....	24
5.2.1. Curva dose-resposta.....	24
5.2.2. Avaliação enzimática .....	27
5.2.3. Avaliação imunohistoquímica.....	28
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	34
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	35

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer, ainda hoje, é considerado um desafio por se tratar de um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. De acordo com a Sociedade Americana do Câncer, as taxas de mortalidade diminuíram na última década, enquanto que a incidência permaneceu estável nos pacientes do sexo feminino, e nos homens diminuiu cerca de 2%, porém os números ainda são alarmantes (SIEGEL, et al., 2019). Devido ao grande impacto social e financeiro à sociedade, é alvo de constantes pesquisas na profilaxia, diagnóstico, tratamento e como conceder qualidade de vida ao paciente já acometido pela doença (PANG; ARGYLE, 2016).

Com o aumento da longevidade dos animais domésticos, o diagnóstico das neoplasias vem crescendo continuamente na Medicina Veterinária. Dentro desse campo, as neoplasias malignas ocorrem usualmente na rotina clínica médica, podendo o mesmo animal apresentar mais de um tumor primário (GRÜNTZIG et al., 2015).

O tratamento pode incluir procedimentos cirúrgicos, medicações quimioterápicas, radioterapia, imunoterapia e criocirurgia (RODASKI et al., 2008). A quimioterapia pode ser curativa ou paliativa no tratamento de vários tipos de neoplasias. Porém, aliado a isso, a maioria dos quimioterápicos apresentam elevada toxicidade, já que os agentes não atuam de forma exclusiva nas células tumorais, causando efeitos colaterais severos nos pacientes (PANG; ARGYLE, 2016). Esses efeitos colaterais cursam de modo agudo ou crônico, afetando a qualidade de vida do paciente, como por exemplo, náuseas, vômitos, fadiga, perda de apetite, diarreia, constipação e dor neuropática, sendo esta última a causa de maior sofrimento ao paciente (PEARCE, et al., 2017).

Atualmente existe grande dificuldade no diagnóstico da dor neuropática tanto em seres humanos como nos animais, por sua diversidade de etiologias (DWORKIN, 2009). Por este motivo, seu tratamento é bastante complexo, onde não existe predileção por uma terapêutica específica. O tratamento pode ser utilizado em associação ou isoladamente, e a maioria dos fármacos apresentam efeitos colaterais severos devendo ser utilizados com cautela (BARON; BINDER; WASNER, 2010).

Estudos demonstraram que alguns antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) podem ser utilizados no tratamento da dor neuropática de forma prolongada e contínua, proporcionando analgesia ao paciente (DICKENSON; SULLIVAN, 1987; EISENBERGL; PUD, 1998; EISENBERGL; LACROSS; STRASSMAN, 1995).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar o potencial efeito antinociceptivo e antioxidante da amantadina em diferentes doses em ratos submetidos a um modelo experimental de neuropatia periférica induzida pela vincristina.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Determinar uma curva dose resposta da amantadina mediante o limiar nociceptivo mecânico;
- Verificar a participação da catalase e do superóxido dismutase no tratamento com amantadina na neuropatia periférica.

### **3. REVISAO DE LITERATURA**

#### **3.1 Fisiologia da Dor**

A dor é classificada como sensação desagradável, que leva a alterações sensoriais e emocionais. Trata-se de mecanismo de defesa do organismo contra danos teciduais, alertando o indivíduo sobre perigo iminente, podendo ser fisiológica ou patológica (STEEDS, 2009). Quando ocorrem estímulos nocivos ao indivíduo, eles são transmitidos do sistema nervoso periférico ao sistema nervoso central, através de vias neuronais, esse mecanismo de transmissão e percepção da dor é chamado de nocicepção (GARLAND, 2012).

Nociceptores são receptores sensoriais do sistema nervoso periférico que podem ser classificados de acordo ao seu diâmetro, sua velocidade de transmissão do estímulo ao sistema nervoso e quanto sua mielinização ou não. As fibras A-delta tem calibre maior e pouco mielinizadas e conduzem estímulos de natureza mecânica e térmica, já as fibras C que não são mielinizadas e estão associadas à condução da segunda dor. A mielinização está diretamente ligada à velocidade de condução do estímulo, quanto maior a mielinização da fibra, maior sua velocidade e intensidade de condução. Esse processo mediado pelos nociceptores se chama transdução, que se projeta do tecido periférico até o corno dorsal da medula, onde ocorre a modulação, e projetados da medula até o córtex cerebral (GARLAND, 2012).

As informações dos estímulos nocivos irão chegar aos terminais pré-sinápticos, através das fibras, causando liberação de substância P e aminoácidos excitatórios, onde ativam e se ligam aos seus receptores nos terminais pós-sinápticos. O principal aminoácido excitatório é o glutamato, que é liberado na fenda sináptica e se liga aos receptores na membrana pós-sináptica. Esses receptores podem ser do tipo metabotrópicos, ou seja, precisa de segundo mensageiro, a proteína G, para ser ativado, tornando o processo mais lento, sendo oito receptores (mGLU1-8), classificados em três grupos (I, II e III). Já os ionotrópicos, podem ser o N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionico (AMPA) e cainato (KA) (KUNER, 2010).

Os receptores ionotrópicos apresentam sítio de recepção ao neurotransmissor por meio de canal iônico e afeta diretamente o fluxo de íons, principalmente sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fazendo com que esse processo seja mais rápido do que por outra via. Já nos receptores metabotrópicos, esse processo acontece de maneira mais lenta porque requer segundo mensageiro para ser ativado (TRAYNELIS, et al, 2010).

A ativação dos receptores NMDA está diretamente ligada à transmissão das fibras aferentes A-delta e C. Os receptores NDMA tem uma maior permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , se comparada aos outros receptores ionotrópicos, durante o seu repouso os íons de  $\text{Mg}^{2+}$  impedem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , porém ao ocorrer a despolarização da membrana, o  $\text{Mg}^{2+}$  é expulso, sucedendo um influxo de Ca intracelular. Altas taxas de glutamato levam a um elevado influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resultando em despolarização membranar mitocondrial e consequente morte neuronal (LAU; TYMIANSKI, 2010).

### **3.2 Dor Neuropática**

Atualmente existem muitas descrições de dor neuropática, de acordo com o Associação Internacional para o estudo da dor (IASP), dor neuropática é definida como dor causada por lesão no sistema nervoso somatosensorial, sendo descrita dor de origem central ou dor de origem periférica. É um tipo de dor crônica que afeta diretamente na qualidade de vida do paciente, podendo desencadear outros problemas, como distúrbios neurológicos e comportamentais. Ainda de acordo com o IASP, a dor neuropática é um sintoma e não diagnóstico, tendo a necessidade de investigação para identificar lesão ou doença que justifique o quadro do paciente (IASP, 1994).

No sistema nervoso periférico, ocorre resposta inflamatória e degeneração devido à lesão direta. Após esses acontecimentos ocorrerá migração de macrófagos para o nervo e raiz dorsal, logo após é liberado no local de lesão substância P, bradicinina e óxido nítrico. Além disso, irá ocorrer liberação de prostaglandinas e citocinas IL-1 beta, IL-6, IL-18 e fator de necrose tumoral (TNF), isso irá induzir a ativação das fibras nociceptivas (SCHOLZ et al., 2005).

O sistema nervoso central tem habilidade de adaptar-se ou modificar-se em resposta a lesões, alterando sua resposta a estímulos. Ocorre após geração ectópica de impulsos nervosos através das fibras A-delta e C, as fibras A-delta apresentam maior geração ectópica de impulsos nervosos em relação às outras fibras. Essa geração de impulso é feita longe do sítio de ação e pode persistir por longos períodos de tempo, fazendo com que ocorra excitabilidade axonal posterior a disfunção dos canais iônicos, ativando receptores que cursam com estímulos crônicos, como os receptores NMDA (STEEDS, 2009).

A micróglia também está diretamente ligada à dor neuropática na medula espinal, ela vai ser ativada após estímulo prolongado, promovendo fagocitose e participando do processamento de sinais que se comunicam com os neurônios, células da glia e do sistema imunológico, no qual vão modular a excitabilidade dos neurônios (SISIGNANO et al., 2014).

A dor neuropática pode acontecer de diversas maneiras e por diferentes causas, mas pode ser dividida a partir de lesão constrictiva crônica, lesão difusa do nervo, neuropatia diabética e pós-herpética (ROGERS et al., 2006). Seu diagnóstico é complexo, onde não existe consenso para descrição desse tipo de dor, o paciente acometido apresenta queixas múltiplas, que muitas vezes não conseguem descrever ou explicar. Na medicina veterinária, especialmente em cães e gatos, a dor neuropática pode acontecer por diversos motivos como trauma, hérnias, fraturas pélvicas, cistite intersticial felina, neuropatia diabética e tumores do sistema nervoso (MATHEWS, 2008).

Pode se manifestar através de hiperalgesia (sensibilidade exarcebada), alodinia mecânica ou por frio (sensibilidade a um estímulo inócuo), dor espontânea e parestesia (sensação desagradável na pele). Pode ocorrer também o fenômeno denominado “*wind up*” que, mesmo sob ausência de estímulos, os nervos periféricos motivam descarga elétrica, ativando os mecanismos da dor (SCHAIBLE; RICHTER, 2004). Dor do membro fantasma é uma síndrome que também pode ocorrer, atribuída à sensibilização periférica como resultado da atividade espontânea de terminações nervosas em regeneração (WEEKS et al., 2010)

### 3.3 Dor neuropática induzida por quimioterápico

Dentre os agentes quimioterápicos, os mais utilizados que comumente causam dor neuropática como efeito adverso são os compostos de platina (cisplatina e carboplatina), taxanos e alcaloides da vinca (vincristina), e mais raramente utilizados, os ixabepilona, bortezomibe e talidomida, sendo diferentes mecanismos e sítios de ação para cada um (MANJI, 2011).

A vincristina é um alcaloide extraído originalmente de planta ornamental chamada *Catharanthus roseus*, endêmica da ilha de Madagascar. Sendo amplamente utilizado no tratamento quimioterápico de neoplasias de células sanguíneas e alguns tumores sólidos, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outro fármaco, principalmente no setor pediátrico humano (LEVEQUE; JEHL, 2007).

O paciente da espécie humana submetido à quimioterapia com o sulfato de vincristina pode apresentar efeitos colaterais em diferentes sistemas, porém a dor neuropática é uma das maiores preocupações durante a administração, por ser um dos principais motivos de redução da dose ou de descontinuidade do tratamento adequado, influenciando no índice de mortalidade do paciente. Seu alto poder neurotóxico manifesta alterações em nervos periféricos, através da dor neuropática periférica, e à nível central, podendo ocorrer mudanças comportamentais e até epilepsia. Esses efeitos colaterais estão diretamente ligados ao tempo de tratamento e dose administrada (GOMBER et al., 2010).

A ocorrência da dor neuropática em pacientes tratados com vincristina é alta e pode ocorrer por diferentes vias, sem necessariamente ter ligações entre elas (GOMBER, et al., 2010). Após a utilização do sulfato de vincristina, irá acontecer no corno dorsal da medula uma modificação na liberação dos neurotransmissores, além de uma interrupção do transporte axonal, causando a degradação desse axônio, por uma cessação do suprimento, acontecendo tanto nas fibras mielinizadas como nas fibras amielinizadas, principalmente na fibra C, que sofre uma alta responsividade excitatória. Essas alterações irão resultar em uma alteração na função e estrutura dos nervos periféricos, causando assim a dor neuropática periférica (THIBAULT, et al., 2013)

A vincristina também irá levar a um estresse oxidativo, quando há uma desproporção entre os agentes antioxidantes e os oxidantes. Pode ocorrer através da liberação do óxido nítrico (NO) pela ação do óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), que é um radical livre gasoso. O NO produzido pelo iNOS é citotóxico ao reagir com espécies de oxigênio, levando a uma destruição celular (OZKUL, et al., 2010)

Nesse processo as mitocôndrias também são afetadas, fazendo com que ocorra uma produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), essa produção de ERO desencadeia um estresse oxidativo. A liberação excessiva de glutamato também pode desencadear esse mesmo processo, aumentando o influxo de cálcio intracelular (CIRCU; AW, 2010).

O organismo tem um sistema endógeno antioxidante que tem como função reduzir os danos ocasionados pelos radicais livres. Essas substâncias podem ser não-enzimáticas ou enzimáticas, as enzimáticas compreendem a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), que atuam atrasando ou inibindo a constituição de radicais livres (SANCHEZ-VALLE; MENDEZ-SANCHEZ, 2018).

A CAT e GPx agem de forma semelhante, diminuindo o peróxido de hidrogênio do organismo, evitando assim que ele reaja com o oxigênio ou íons de ferro ou cobre e se transforme em hidroxila (OH), na qual não há sistema enzimático de defesa. Já a SOD fará o mesmo mecanismo, porém realizará uma dismutação, ou seja, oxidará uma molécula e reduzirá proporcionalmente a outra, no caso duas moléculas de superóxido para uma de peróxido de hidrogênio e oxigênio (FATTMAN et al. 2003).

### **3.4 Amantadina**

As medicações neuroprotetoras reduzem a excitotoxicidade, limitando a isquemia cerebral, e protegendo a célula neuronal dos agentes oxidantes e aminoácidos excitatórios. Os fármacos antagonistas do receptor NMDA tem ação neuroprotetora, devido à ligação direta do receptor ionotrópico do glutamato no mecanismo de morte celular. Eles podem ser competitivas ou não competitivas, os competitivos irão competir diretamente com o sítio de ligação do glutamato,

enquanto que o não competitivo impede o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular indiretamente. Entre as medicações antagonistas NMDA estão o dextrometorfano, dextrorfano, quetamina, memantina e amantadina (GAGLIARDI, 2000).

A amantadina é uma amina tricíclica sintética hidrossolúvel descoberta por Wingfield em 1956, um antagonista não competitivo dos receptores NMDA, inicialmente utilizado como antiviral no tratamento do vírus *Influenza A* e no tratamento para a doença de Parkinson. Após a descoberta da função dos receptores NMDA na modulação da dor, começou a ser utilizada no tratamento para dor crônica pós-operatória (SNIJDELAAR et al., 2004) e sendo utilizada de forma contínua durante um período de tempo maior, com efeitos colaterais brandos (EISENBERGL; PUD, 1998).

Esse fármaco também tem função neuroprotetora, através da diminuição do estresse oxidativo por meio da prevenção da ativação microglial. Auxiliando na proteção da célula contra degenerações e alterações celulares provenientes de um fármaco ou patologia. Além disso, também foi visto que ela tem ação sob a ativação inflamatória da microglia (KIM, *et al.*, 2012).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) sob o número 33/2018 e executada de acordo com os princípios éticos da experimentação animal.

### 4.1 Animais e condições de alojamento

Foram utilizados 64 ratos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, machos, com 45 dias de vida, pesando entre 200-250g, oriundos do laboratório de criação, manutenção e experimentação animal (LaBio) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Ficaram acondicionados em caixas plásticas, contendo quatro animais em cada caixa, alimentados com ração comercial e água em abundância. O ambiente era controlado com um ciclo de claro-escuro de 12 horas, com temperatura controlada entre 22 e 25°C. Antes do início do experimento, eles passaram por um período de sete dias de ambientação.

### 4.2. Modelo de dor e grupos experimentais

Para a realização do modelo de dor neuropática experimental, foi administrado sulfato de vincristina, na dose de 0,05 mg/kg/dia por via intraperitoneal (IP), durante 8 dias. Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos (n=8) e receberam:

- Neive: Animais não receberam nenhum fármaco ou veículo (*naive*).
- Controle negativo: Animais receberam solução salina via intraperitoneal.
- Controle positivo: Animais receberam sulfato de vincristina (0,05 mg/kg/IP).
- Amantadina 25 mg: Animais receberam Amantadina (25mg/kg/VO/dia) uma hora antes da administração do sulfato de vincristina (0,05 mg/kg/IP).
- Amantadina 50 mg: Animais receberam Amantadina (50mg/kg/VO/dia) uma hora antes da administração do sulfato de vincristina (0,05 mg/kg/IP)
- Amantadina 75 mg: Animais receberam Amantadina (75mg/kg/VO/dia) uma hora antes da administração do sulfato de vincristina (0,05 mg/kg/IP)
- Amantadina 100 mg: Animais receberam Amantadina (100mg/kg/VO/dia) uma hora antes da administração do sulfato de vincristina (0,05 mg/kg/IP)
- Amantadina 125 mg: Animais receberam Amantadina (125mg/kg/VO/dia) uma hora antes da administração do sulfato de vincristina (0,05 mg/kg/IP)

A Amantadina (Mantidan® 100mg, Eurofarma®) foi administrada por via oral através de gavagem com uma cânula específica.

### **4.3. Avaliação do limiar nociceptivo mecânico, obtenção das amostras e eutanásia dos animais**

Para avaliação mecânica nociceptiva, cada animal foi posicionado em uma malha de metal separadamente, após 30 minutos de ambientação e conseqüentemente diminuição da exploração local, foi realizada avaliação com o analgesímetro digital na superfície plantar do pé direito. Para melhor acurácia desse parâmetro, o aparelho foi previamente testado e validado e o avaliador foi treinado para tal procedimento, a fim de estabelecer uma força pré-definida para estimular os animais e, conseqüentemente, diminuir esse viés. Além disso, o avaliador desconhecia o tratamento instituído em cada grupo. A avaliação foi realizada duas horas após a administração do sulfato de vincristina e uma hora após a administração da amantadina.

O analgesímetro digital consiste em um transdutor de pressão, que se conecta a um contador de força onde expõe em gramas o resultado, o mesmo foi calibrado com uma precisão de 2-100g. Uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5mm de diâmetro foi colocada em contato com o animal, na superfície plantar do pé direito do animal, fazendo com que o animal reagisse ao estímulo em forma de retirada do membro, e o valor medido pelo aparelho.

Ao final do período, no 8<sup>a</sup> dia, todos os animais foram eutanasiados com sobredose de propofol (Propotil® 1%, Bio Chimico®) 150mg/kg, via intravenosa e logo após a cessação dos batimentos cardíacos foi coletado 9mm da medula espinal, na porção lombar, onde metade foi congelada em uma temperatura -80°C, e a outra metade (4,5mm) foi acondicionada em paraformol 4%, durante 24 horas, sendo realocada para o álcool 70% durante sete dias, posteriormente álcool 80%, 90% e absoluto durante uma hora em cada, 30 minutos no xilol e parafina para ser posto em um bloco de parafina para finalização. Após o emblocamento, foi cortado fragmentos de 4µm de espessura e realocado em laminas gelatinizadas para posterior avaliação imunohistoquímica.

#### 4.4 Avaliação do estresse oxidativo

Todas as reações enzimáticas foram avaliadas a partir da amostra de medula espinal processada e armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O processamento do extrato bruto da medula foi realizada a partir de sonicamento (Cole-Parmer Ultrasonic Processor®) sob amplitude de 70% com 8 pulsos de 5 segundos (ON) e intervalos de 10 segundos (OFF) no total 40 segundos com solução tampão fosfato de potássio e centrifugada (Eppendorf®, Centrifuge 5417R) sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ), para obtenção de  $80\mu\text{L}$  de sobrenadante da amostra e armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A quantificação da proteína foi realizada a partir do método colorimétrico descrito por Bradford (1976), baseado no complexamento de proteínas com Azul G Brilhante. Foi utilizada uma microplaca de 96 poços, onde foi colocado  $150\mu\text{L}$  de BSA  $0,1\text{mg}/\text{mL}$ ,  $50\mu\text{L}$  de TFK ( $50\text{mM}$ ,  $\text{pH } 7,0$ ) e  $40\mu\text{L}$  de TFK com  $10\mu\text{L}$  da amostra (1:20) sempre realizada em triplicata, seguido de  $200\mu\text{L}$  de Coomassie Blue G250 (Sigma B-0770). Após incubação por 15 minutos procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Paradigm - Multi-Mode Detection Platform) no comprimento de onda de  $595\text{nm}$ . A concentração de proteína foi calculada através de uma curva de diluição padrão de BSA a  $0,1\text{mg}/\text{mL}$

A enzima catalase foi mensurada com a técnica de espectrofotometria (Thermo Scientific®, Evolution 60) a  $240\text{nm}$ , durante 150 segundos, em intervalos de 15 segundos. Em uma cubeta de quartzo, foi adicionado  $1800\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de potássio, medido o branco e adicionado  $120\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), após 45 segundos foi adicionado  $9\mu\text{L}$  da amostra e completado leitura até o final. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína. (AEBI, 1984).

A superóxido dismutase foi determinada através da medula espinal, adicionado a  $10\text{mM}$  de solução tampão de fosfato de potássio e  $50\text{mM}$  de ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), em seguida foi adicionado  $2\text{mM}$  de pirogalol e com a espectrofotometria (Thermo Scientific®, Evolution 60), foi medido a sua

oxidação, a 430nm, durante 5 minutos, em intervalos de 30 segundos, Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína. (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

#### **4.5. Imunohistoquímica**

As lâminas gelatinizadas contendo três fragmentos de medula espinal foram submetidos aos anticorpos Anti-SOD1 (SC101523, Santa Cruz) e Anti-catalase (SC/271803; Santa Cruz), A técnica utilizada foi a da estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit Elite ABC, Vector Laboratories®, Burlingame, CA, EUA), após posterior recuperação antigênica pelo calor em banho maria a 98°C com solução Retrieval, as lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio e estreptavidina peroxidase. O anticorpo secundário foi utilizado na posterior incubação por 45 minutos. As secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por IgG. Os dados de cada tecido foram arquivados, analisados e expressos como intensidade e área de imunomarcção em pixels, utilizando o software Image J (National Institutes of Health, EUA) (SILVA, 2014)..

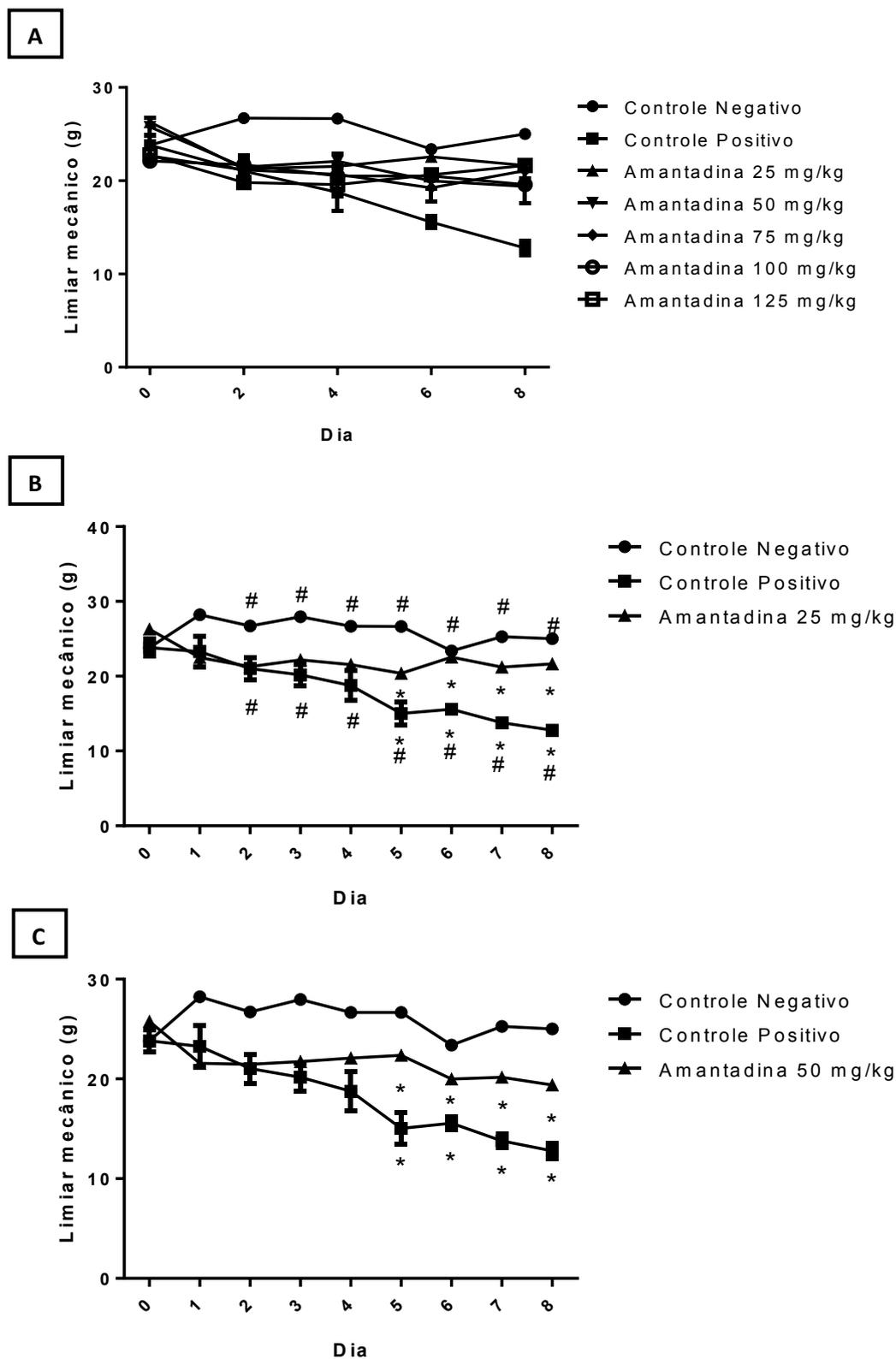
#### **4.6. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o Graph Pad Prism Software versão 8.0.2. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os valores médios com o erro padrão. Os dados da imunohistoquímica e da atividade enzimática foram analisados verificando a normalidade dos resíduos pelo teste *Bartlett's* e os dados que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [ $x = \text{Log}(y+1)$ ]. Os dados, então, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni para comparação das médias. Os dados que não seguiram distribuição normal foram analisadas através do teste de Kruskal Wallis. As diferenças foram consideradas significativas se  $P < 0,05$ .

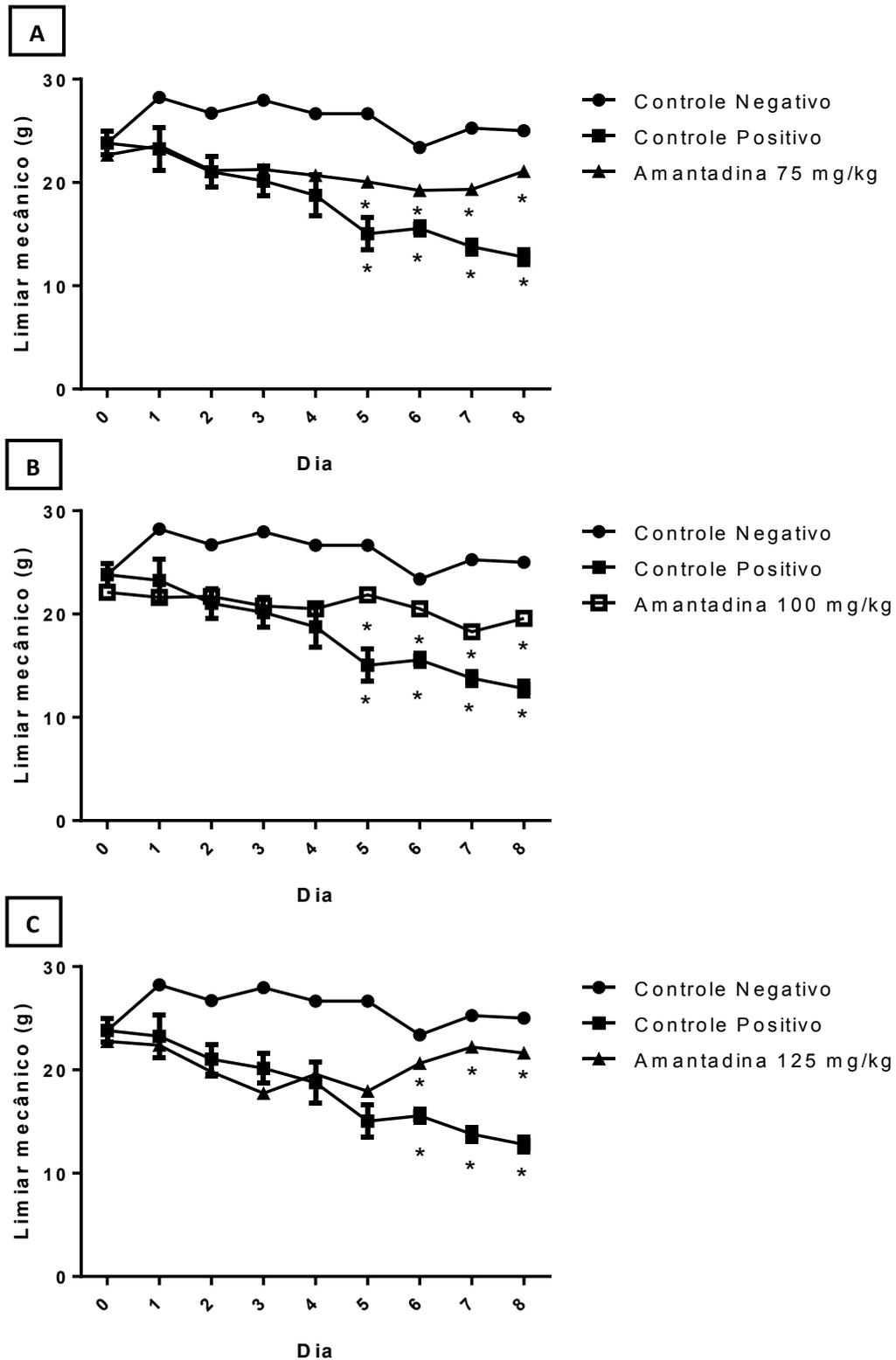
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Curva dose-resposta

Foram investigadas cinco doses diferentes de amantadina (25, 50, 75, 100 e 125 mg/kg, V.O.). Os resultados obtidos foram (média  $\pm$  erro padrão médio): grupo controle negativo ( $25,97 \pm 0,5687$ ), grupo controle positivo ( $18,25 \pm 1,370$ ), grupo amantadina 25 mg ( $22,18 \pm 0,5641$ ), grupo amantadina 50 mg ( $21,62 \pm 0,6208$ ), grupo amantadina 75 mg ( $21,01 \pm 0,4780$ ), grupo amantadina 100 mg ( $20,77 \pm 0,4129$ ), grupo amantadina 125 mg ( $20,52 \pm 0,6292$ ). Houve diferença entre os grupos controle negativo e controle positivo (Figura 1). Não houve diferença significativa entre as doses de Amantadina, porém ocorreu diferença entre as diferentes doses de amantadina e o controle positivo (Figura 1 e 2).



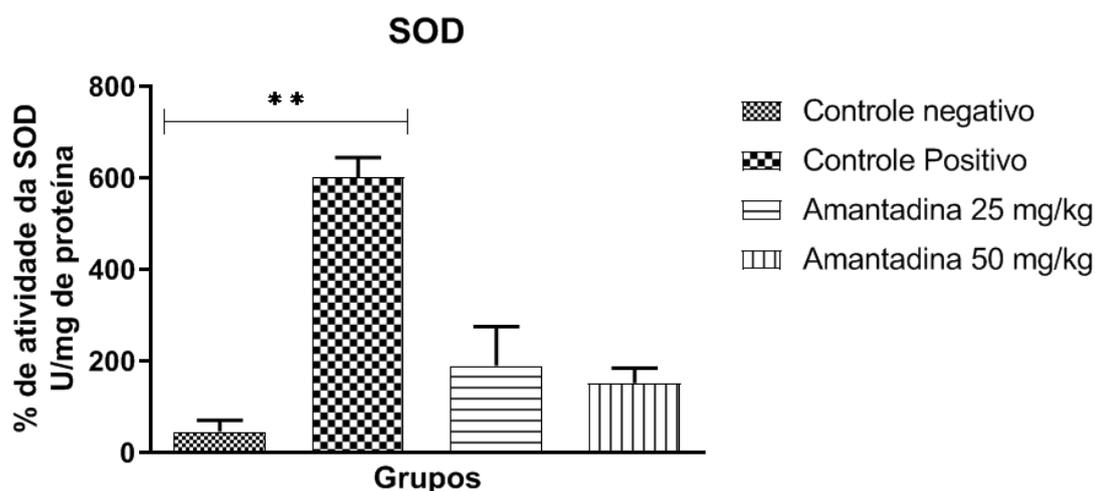
**Figura 1** - Curva dose resposta da amantadina. Média e erro padrão médio da resposta do limiar mecânico (g) nos ratos submetidos a dor neuropática quimioterápica periférica em todos os grupos avaliados (A) e os grupos controle em relação aos grupos Amantadina 25 e 50 mg/kg (B e C, respectivamente) . Símbolos diferentes expressam significância estatística, diferença entre grupo controle positivo e grupo tratado amantadina 25 e 50 (\*), diferença entre grupo controle negativo e positivo (#) (\* e #  $p < 0,05$ ).



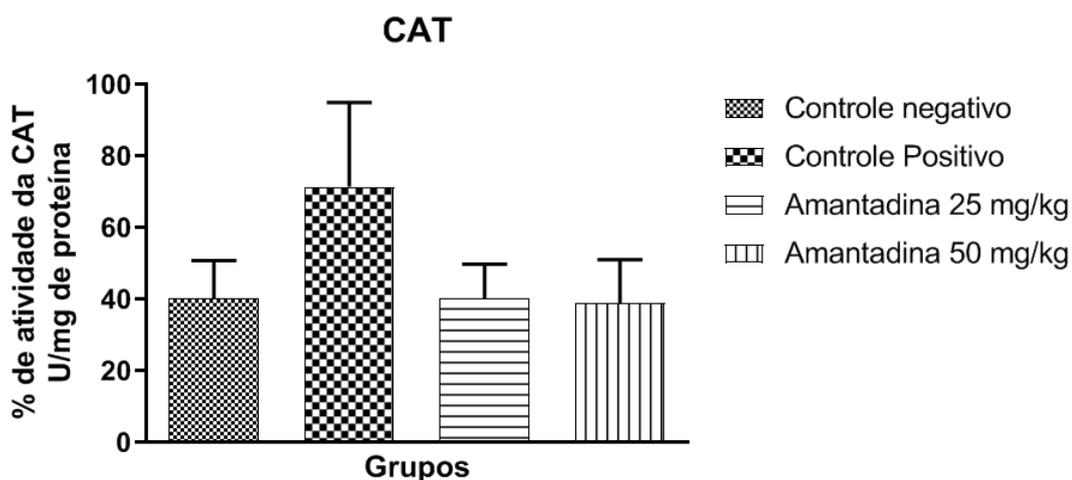
**Figura 2** - Curva dose resposta da amantadina. Média e erro padrão médio da resposta do limiar mecânico (g) nos ratos submetidos a dor neuropática quimioterápica periférica. Grupos controle positivo e negativo em relação os grupos Amantadina 75, 100 e 125 mg/kg (A, B e C, respectivamente). Símbolos diferentes expressam significância estatística, diferença entre grupo controle positivo e grupo tratado amantadina 75, 100 e 125 (\*) \*  $p < 0,05$ .

## 5.2. Avaliação enzimática

As enzimas antioxidantes endógenas, como a SOD e a CAT, foram avaliadas. Na figura 3, os valores encontrados da SOD foram (média  $\pm$  erro padrão médio): grupo controle negativo ( $46,44 \pm 24,43$ ), grupo controle positivo ( $602,2 \pm 43,04$ ), grupo amantadina 25 mg ( $190,6 \pm 85,11$ ) e grupo amantadina 50 mg ( $152,4 \pm 32,53$ ). Em relação à CAT, os seguintes valores foram (média  $\pm$  erro padrão médio): grupo controle negativo ( $40,22 \pm 10,58$ ), grupo controle positivo ( $71,43 \pm 23,57$ ) grupo amantadina 25 mg ( $40,30 \pm 9,513$ ) e grupo amantadina 50 mg ( $38,93 \pm 12,14$ ) (Figura 4). Pode-se observar diferença significativa somente na avaliação da SOD, entre os grupos controle negativo e controle positivo, na CAT não houve diferença estatística.



**Figura 3** - Média e erro padrão médio da SOD em ratos (n=8), administração de solução salina (controle negativo), administração de vincristina (controle positivo) e as duas doses de amantadina 25 e 50mg/kg. (\*\*p<0,05).

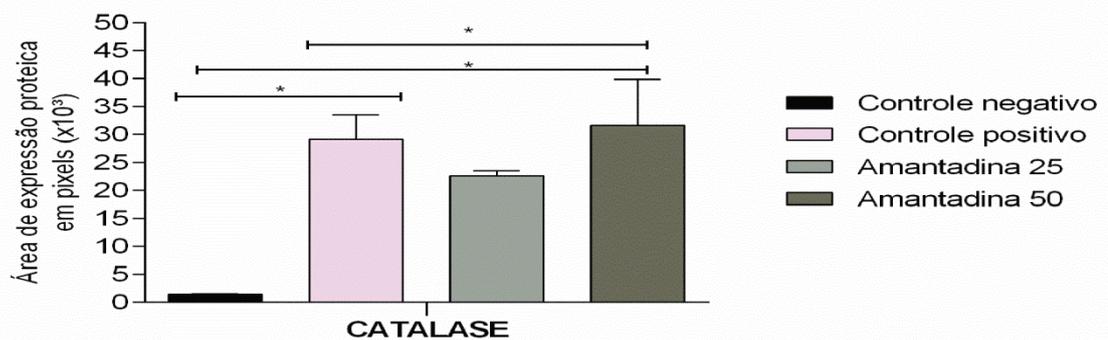
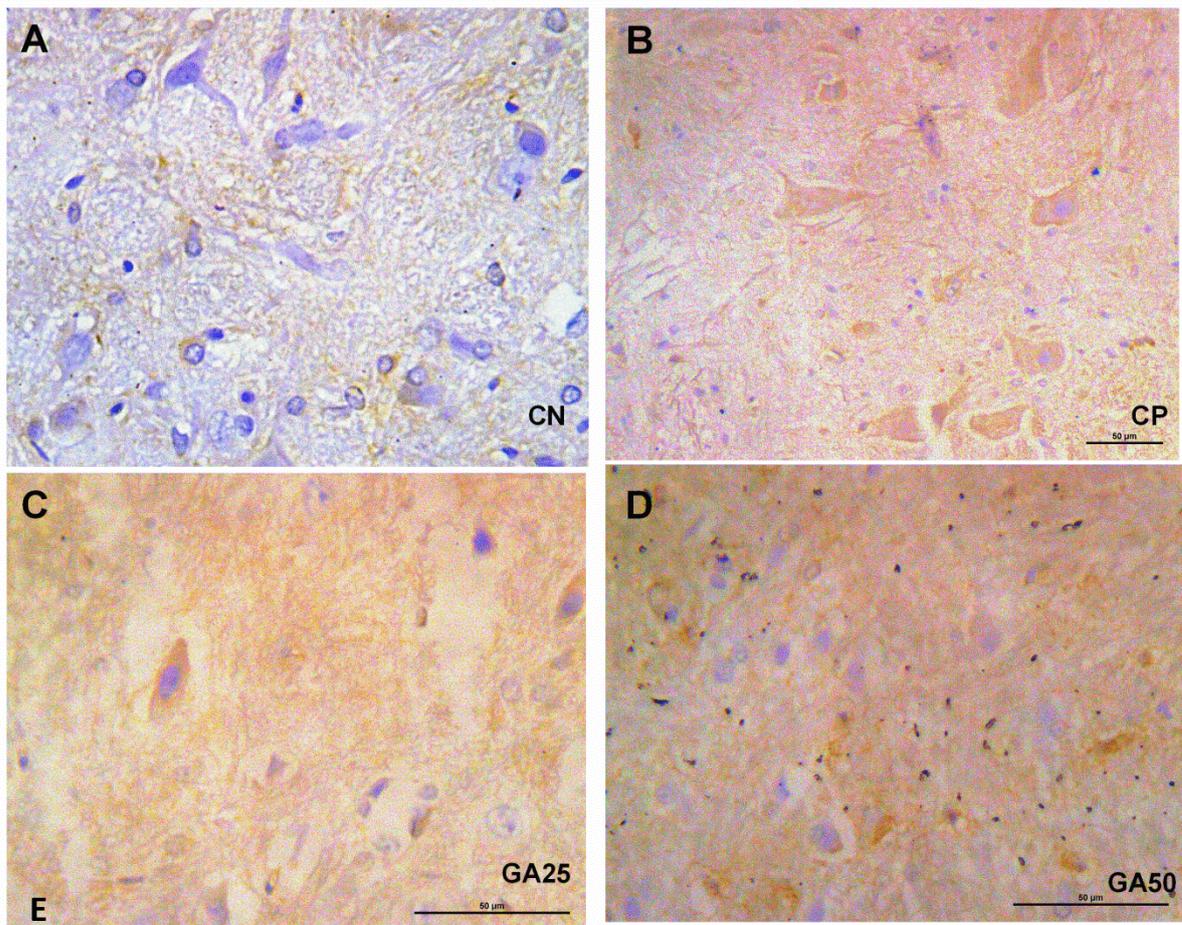


**Figura 4** - Média e erro padrão médio da CAT em ratos (n=8), administração de solução salina (controle negativo), administração de vincristina (controle positivo) e as duas doses de amantadina 25 e 50mg/kg.

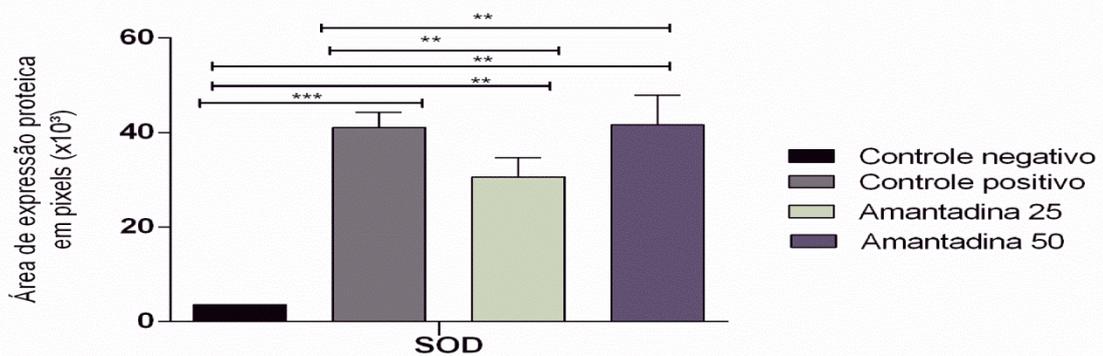
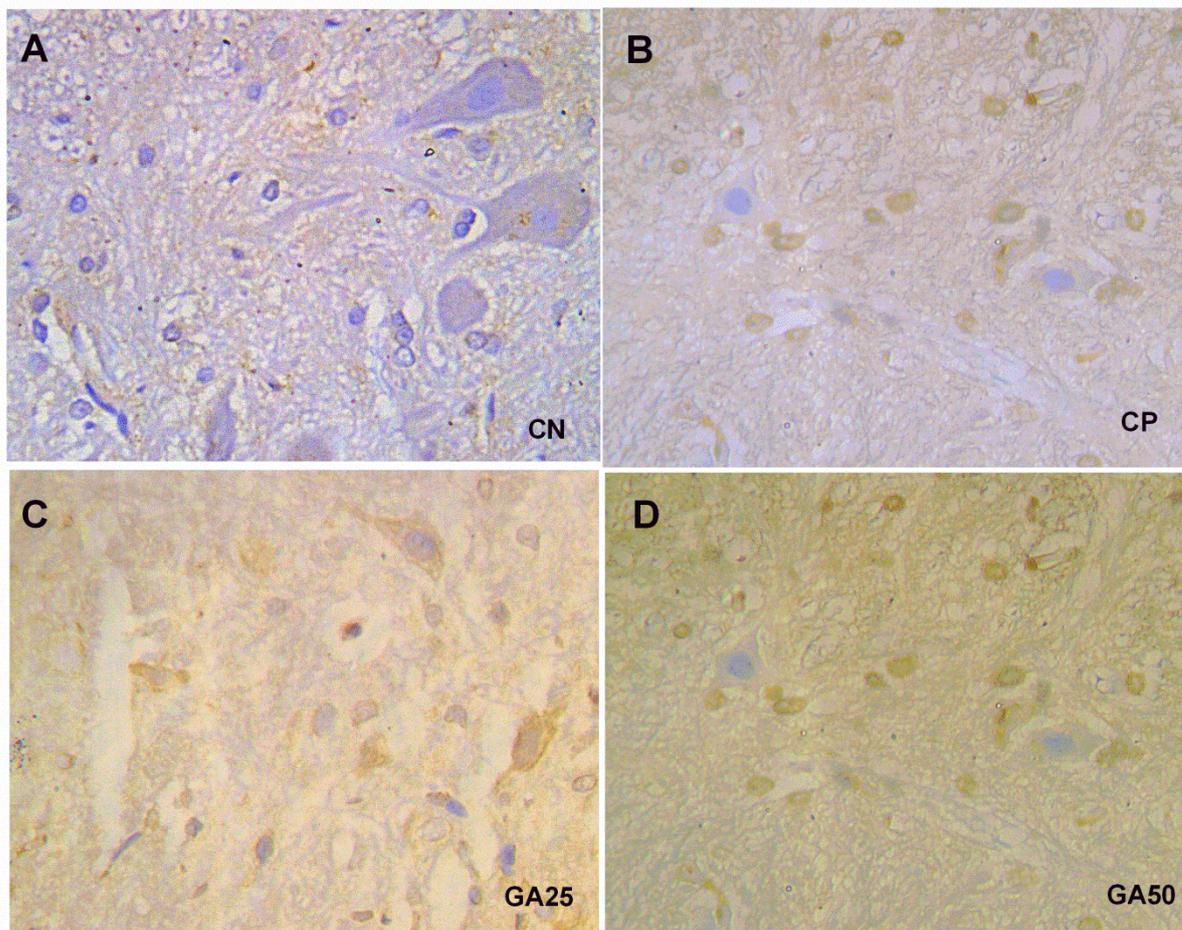
### 5.3 Avaliação imunohistoquímica

Na avaliação imunohistoquímica houve expressão de CAT citoplasmática nos neurônios, neuropilo e substância branca. Os grupos de neuropatia (controle positivo) e de neuropatia e tratamento com amantadina 25 mg e 50 mg tiveram expressão mais intensa em relação ao controle negativo. ( $P < 0,05$ ) (Figura 5).

Já na SOD houve marcação citoplasmática também de neurônios, substância branca e neuropilo. O grupo controle negativo teve menos marcação citoplasmática em comparação ao controle positivo e os grupos tratados, porém sem diferença estatística de marcação entre os grupos tratados (Figura 6).



**Figura 5** - Expressão de CAT no corno dorsal da medula espinal dos ratos submetidos neuropatia quimioterápica e administração de solução salina (n=8) A, B, C e D: Imagens imunohistoquímicas da baixa expressão de CAT (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 40µm) E: Aumento da área de expressão da CAT nos grupos controle positivo, amantadina 25 e 50 no citoplasma dos neurônios e substancia branca em comparação ao grupo controle negativo. (\*p<0,05).



**Figura 6** - Expressão de SOD no corno dorsal da medula espinal dos ratos submetidos neuropatia quimioterápica e administração de solução salina (n=8) A, B, C e D: Imagens imunoistoquímicas da baixa expressão de SOD (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 40µm) E: Aumento da área de expressão da SOD nos grupos controle positivo, amantadina 25 e 50 no citoplasma dos neurônios e substancia branca em comparação ao grupo controle negativo C

## 6. DISCUSSÃO

Este estudo permitiu avaliar uma curva dose resposta dentre da amantadina nas doses (25, 50, 75, 100 e 125 mg/kg), para determinar uma melhor dose da amantadina com efeito benéfico para o tratamento da dor neuropática em ratos.

No presente estudo foi visto que a amantadina tem efeito inibidor da neuropatia periférica em todos os grupos tratados. Provavelmente, esses resultados de inibição da amantadina podem ser devido ao fato que inibidores dos receptores NMDA bloqueiam ativação glial na medula espinal, impedindo a fosforilação do receptor NMDA, impedindo o influxo de  $Ca^{2+}$  intracelular. Esse influxo de  $Ca^{2+}$  ativa o NO, que na fenda pré-sináptica causará uma liberação exagerada de substâncias P e aminoácidos excitatórios, tudo isso irá fazer com que ocorra a ativação glial na medula espinal dos ratos (AMIN; STURROCK, 2003; JI, *et al.*, 2013; CAROZZI, *et al.*, 2015).

A vincristina foi escolhida pelo fato de ser um agente amplamente utilizado na rotina de terapias antineoplásicas. Após a terapia quimioterápica irá ocorrer um aumento na expressão do receptor 5-hidroxitriptamina (5-HT), um receptor de neurotransmissores de sinais periféricos. Além disso, ela induz uma toxicidade neuronal através de um aumento na liberação de neurotransmissores excitatórios na membrana pós-sináptica, como o glutamato (THIBAUT, *et al.*, 2013; ADDINGTON; FREIMER, 2016). O receptor NMDA irá ser ativado por uma estimulação prolongada, causando um aumento na atividade dos canais de  $Ca^{2+}$  nos neurônios sensoriais do corno dorsal da medula (PARK, 2014).

Diferentes estudos em tipos de dor neuropática demonstraram eficácia da amantadina, como no tratamento pós-cirúrgica associada à dor neuropática em humanos (EISENBERG; PUD, 1998; PUD, *et al.*, 1998), dor neuropática diabética em humanos (AMIN; STURROCK, 2003) e no tratamento da dor crônica em cachorros (LASCELLES, *et al.*, 2008). Já no tratamento da dor neuropática crônica induzida por lesão constritiva em nervo no rato, a amantadina não foi eficaz (COFFEEN, *et al.*, 2009)

Com relação à instituição da dor neuropática periférica quimioterápica, os resultados demonstraram que a dor neuropática foi estabelecida nos ratos com a administração do sulfato de vincristina na dose de 0,05 mg/kg/I.P., onde visualizou-se a instituição da dor neuropática a partir do 2º dia de tratamento, como descrito por Siau & Bennet (2006) e Muthuraman, *et al.* (2008) que utilizaram a mesma dosagem, resultando em um efeito acumulativo da vincristina.

O tratamento quimioterápico com a vincristina promove uma ativação do NOS, que induz a liberação do NO, e que por sua vez é citotóxico ao reagir com as ERO (WANG, *et al.*, 2011). As ERO são produzidas nos processos metabólicos aeróbicos celulares, para exercer sua função no organismo fisiologicamente. Não há necessidade de uma grande quantidade, porém durante o processo de estresse oxidativo, há um aumento na sua produção (VAQUERO, *et al.*, 2004). Outros imunomediadores como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 $\beta$  e interferon  $\gamma$ , vão modular a transmissão excitatória. Todos esses mecanismos irão ocasionar neurotoxicidade podendo evoluir para morte celular (GRACE, *et al.*, 2014).

Levando em consideração a grande quantidade de ERO liberadas durante a administração dos agentes antineoplásicos aos pacientes submetidos à quimioterapia (WEIJIL, *et al.*, 1998; GOMBER, *et al.*, 2010; JAIN, *et al.*, 2013; SMITH, *et al.*, 2015), diversas vias de sinalização antioxidativas são ativadas, na tentativa de reverter esse quadro, como por exemplo as enzimas antioxidantes endógenas, CAT, SOD e GPx, que são liberadas nos nervos periférico e no corno dorsal da medula (DUGGETT, *et al.*, 2016). A CAT é uma enzima antioxidante que não é distribuída uniformemente por todo o organismo, da mesma forma que a alta produção de ERO também é um evento localizado, dessa forma a CAT é direcionada para o sítio de lesão (NISHIKAWA, *et al.*, 2009). Esses agentes antioxidantes estão localizados em diferentes locais intra e extracelulares. A SOD, por exemplo, pode estar localizada nas mitocôndrias, citoplasma e extracelularmente (STURTZ, *et al.*, 2001), já a CAT pode ser encontrada nos peroxissomos e citoplasma (NISHIKAWA, *et al.*, 2002). Porém com maior marcação nos grupos controle positivo e nos grupos tratados com amantadina nas doses de 25 e 50 mg/kg, constatando que a amantadina não interfere na ativação da CAT e SOD.

Baseado nos resultados encontrados no presente estudo, provavelmente a amantadina possa atuar por outras vias antioxidativas e que levam a neuroproteção.

Outros trabalhos sugeriram que seu mecanismo protetor possa estar relacionado com um aumento de dopamina através da inibição da recaptação de dopamina e noroadrenalina nas terminações nervosas (THRASH-WILLIAMS, *et al.*, 2013). Já Ossola *et al.* (2011) afirmou que a via de inibição do receptor NMDA não é a mais importante para o fator de neuroproteção da amantadina, e sugeriram um novo mecanismo duplo através da redução da liberação de fatores pró-inflamatórios da microglia e aumento da expressão do fator neurotrófico derivado da glia. Além disso, há trabalhos que relatam a ação da amantadina na diminuição de níveis pró-inflamatórios dos macrófagos ativados, direcionando para um molde antiinflamatório (ROMAN, *et al.*, 2009).

A ação antioxidante e de neuroproteção ainda é um desafio, a neuroproteção vai interromper a cascata de excitotoxicidade, porém existem algumas limitações para a utilização dessa alternativa, como por exemplo, iniciar o fármaco na janela terapêutica correta (GAGLIARDI, 2000). Ainda é necessário novos estudos para entender melhor o mecanismo de ação da amantadina como antioxidante e o seu efeito como inibidor da dor neuropática periférica.

## **7. CONCLUSÃO**

A amantadina promoveu efeito inibidor da neuropatia periférica induzida pela vincristina. Além disso, ela não interfere na ativação da catalase e superóxido dismutase, sugerindo que a função neuroprotetora não age por essa via. Nossos dados apontam o potencial uso terapêutico da amantadina para o tratamento de pacientes com dor neuropática periférica induzida pela quimioterapia.

## 8. REFERÊNCIAS

ADDINGTON, James; FREIMER, Miriam. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: an update on the current understanding. **F1000Research**, v. 5, 2016.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126 1984.

AMIN, P.; STURROCK, N. D. C. A pilot study of the beneficial effects of amantadine in the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy. **Diabetic medicine**, v. 20, n. 2, p. 114-118, 2003.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G.. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

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

COFFEEN, Ulises; LÓPEZ-ÁVILA, Alberto; PELLICER, Francisco. Systemic amantadine diminishes inflammatory and neuropathic nociception in the rat. **Salud Mental**, v. 32, n. 2, p. 139-144, 2009.

DICKENSON, A.H. SULLIVAN, A.F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following c fibre stimulation. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 8, p. 1235-1238, 1987.

DWORKIN, R.H. Introduction: recommendations for the diagnosis, assessment, and treatment of neuropathic pain. **The American Journal of Medicine**, 2009.

DUGGETT, Natalie A. et al. Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. **Neuroscience**, v. 333, p. 13-26, 2016.

EISENBERG, Elon; PUD, Dorit. Can patients with chronic neuropathic pain be cured by acute administration of the NMDA receptor antagonist amantadine?. **Pain**, v. 74, n. 2-3, p. 337-339, 1998.

FATTMAN, C. L.; SCHAEFER, L. M.; OURY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 3, p. 236-256, 2003.

GARLAND, E. L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 39, n. 3, p. 561-571, 2012.

GAGLIARDI, Rubens José. Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 58, n. 2B, p. 583-588, 2000.

GOMBER, Sunil; DEWAN, Pooja; CHHONKER, Devender. Vincristine induced neurotoxicity in cancer patients. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 77, n. 1, p. 97-100, 2010.

GRACE, Peter M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217-231, 2014.

GRÜNTZIG, K., *et al.* The Swiss Canine Cancer Registry: a retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. **Journal of comparative pathology**, v. 152, n. 2-3, p. 161-171, 2015.

Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) **Classification of Chronic Pain**, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy, edited by H. Merskey and N. Bogduk, IASP Press, Seattle, ©1994

JAIN, P., Gulati, S., Seth, R., Bakhshi, S., Toteja, G. S., & Pandey, R. M. . *Vincristine-induced Neuropathy in Childhood ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia) Survivors*. **Journal of Child Neurology**, 29(7), 932–937, 2013.

KIM, Jong-Heon et al. Microglia-inhibiting activity of Parkinson's disease drug amantadine. **Neurobiology of aging**, v. 33, n. 9, p. 2145-2159, 2012.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258, 2010.

LASCELLES, B. D. X. et al. Amantadine in a multimodal analgesic regimen for alleviation of refractory osteoarthritis pain in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 1, p. 53-59, 2008.

LAVOIE SMITH, Ellen M. et al. Patterns and severity of vincristine-induced peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 20, n. 1, p. 37-46, 2015.

LAU, A.; TYMIANSKI, M.. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 460, n. 2, p. 525-542, 2010.

LEVÊQUE, D.; JEHL, F.. Molecular pharmacokinetics of catharanthus (vinca) alkaloids. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 5, p. 579-588, 2007.

LORUSSO, D., *et al.* Patients' perception of chemotherapy side effects: Expectations, doctor–patient communication and impact on quality of life—An Italian survey. **European journal of cancer care**, v. 26, n. 2, p. e12618, 2017.

KALEY, Thomas J.; DEANGELIS, Lisa M. Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **British journal of haematology**, v. 145, n. 1, p. 3-14, 2009.

MANJI, H. Toxic neuropathy. **Current opinion in neurology**, v. 24, n. 5, p. 484-490, 2011.

MANJI, Hadi. Toxic neuropathy. **Current opinion in neurology**, v. 24, n. 5, p. 484-490, 2011.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MATHEWS, Karol A. Neuropathic pain in dogs and cats: if only they could tell us if they hurt. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 6, p. 1365-1414, 2008.

MUTHURAMAN, Arunachalam et al. Ameliorative effects of amiloride and pralidoxime in chronic constriction injury and vincristine induced painful neuropathy in rats. **European journal of pharmacology**, v. 587, n. 1-3, p. 104-111, 2008.

NISHIKAWA, Makiya et al. Inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice. **International journal of cancer**, v. 99, n. 3, p. 474-479, 2002.

NISHIKAWA, Makiya; HASHIDA, Mitsuru; TAKAKURA, Yoshinobu. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 4, p. 319-326, 2009.

OSSOLA, Bernardino et al. Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 4, p. 574-582, 2011.

OZKUL, Ayca et al. The role of oxidative stress and endothelial injury in diabetic neuropathy and neuropathic pain. **Neuroendocrinology Letters**, v. 31, n. 2, p. 261-264, 2010.

PANG, L. Y; ARGYLE, D. J. Veterinary oncology: Biology, big data and precision medicine. **The Veterinary Journal**. v. 213, p. 38-45, 2016.

PARK, Pojeong et al. NMDA receptor-dependent long-term potentiation comprises a family of temporally overlapping forms of synaptic plasticity that are induced by different patterns of stimulation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1633, p. 20130131, 2014.

PEARCE, A. *et al.* Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. **Plos one**, v. 12, n. 10, 2017.

PUD, Dorit et al. The NMDA receptor antagonist amantadine reduces surgical neuropathic pain in cancer patients: a double blind, randomized, placebo controlled trial. **Pain**, v. 75, n. 2-3, p. 349-354, 1998.

RODASKI, S.; DE NARDI, A.B.; PIEKARZ, C.H. Quimioterapia antineoplásica. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 9, p. 161-173.

ROGERS, Marc et al. The role of sodium channels in neuropathic pain. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2006. p. 571-581.

ROMAN, Adam et al. Concomitant administration of fluoxetine and amantadine modulates the activity of peritoneal macrophages of rats subjected to a forced swimming test. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 6, p. 1069-1077, 2009.

SÁNCHEZ-VALLE, V.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N.. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. **Médica Sur**, v. 20, n. 3, p. 161-168, 2018.

SCHAIBLE, H.; RICHTER, F.. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's archives of surgery**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHOLZ, J.; BROOM, D. C.; YOUN, D. H.; MILLS, C. D.; KOHNO, T.; SUTER, M. R.; MOORE, K. A.; DECOSTERD, I.; COGGESHALL, R. E.; WOOLF, C. J. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 25, n. 32, p. 7317-7323, 2005.

SIAU, Chiang; BENNETT, Gary J. Dysregulation of cellular calcium homeostasis in chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. **Anesthesia and analgesia**, v. 102, n. 5, p. 1485, 2006.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A.. Cancer statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7-34, 2019.

SILVA, J.F. **Efeitos dos hormônios tireoidianos na cinética de migração das células trofoblásticas e no perfil endócrino, angiogênico e imune da placenta de ratas e na expressão gênica das células trofoblásticas de camundongo**. 2014. 162f. Tese (Doutorado em Patologia Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014

SISIGNANO, Marco et al. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 12, p. 694, 2014.

SMITH L., Ellen M. et al. Patterns and severity of vincristine-induced peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 20, n. 1, p. 37-46, 2015.

SNIJDELAAR, D. G.; KOREN, G.; KATZ, J. Effects of Perioperative Oral Amantadine on Postoperative Pain and Morphine Consumption in Patients after Radical Prostatectomy Results of a Preliminary Study. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 100, n. 1, p. 134-141, 2004

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery (Oxford)**, v. 27, n. 12, p. 507-511, 2009.

STURTZ, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill, R. & Culotta, V.C. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. **Journal of Biological Chemistry**, 276, 38084–38089 2001.

THIBAUT, K. et al. Structural and molecular alterations of primary afferent fibres in the spinal dorsal horn in vincristine-induced neuropathy in rat. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 51, n. 3, p. 880-892, 2013.

THRASH-WILLIAMS, Bessy et al. Assessment of therapeutic potential of amantadine in methamphetamine induced neurotoxicity. **Neurochemical research**, v. 38, n. 10, p. 2084-2094, 2013.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 3, p. 405-496, 2010.

VAQUERO, E.C., Edderkaoui, M., Pandol, S.J., Gukovsky, I. & Gukovskaya, A.S. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**. 27, 34643–34654 (2004)

Wang W, Sun Y, Li X, Li H, Chen Y, Tian Y, Yi J, and Wang J. Emodin potentiates the anticancer effect of cisplatin on gallbladder cancer cells through the generation of reactive oxygen species and the inhibition of survivin expression. *Oncol Rep* 26: 1143–1148, 2011

WEEKS, Sharon R.; ANDERSON-BARNES, Victoria C.; TSAO, Jack W. Phantom limb pain: theories and therapies. **The neurologist**, v. 16, n. 5, p. 277-286, 2010.

WEIJL NI, Hopman GD, Wipkink-Bakker A, et al. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. **Annals of Oncology**. 9:1331-1337, 1998.