UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA PROGRAMA DE NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

Andrea Maia Carvalho

EFEITO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NA AÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE RNA NOS SISTEMAS NOCICEPTIVO E MUSCULAR

São Paulo

2017

ANDREA MAIA CARVALHO

EFEITO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NA AÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE RNA NOS SISTEMAS NOCICEPTIVO E MUSCULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Araújo Lucas

São Paulo

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Maia Carvalho, Andrea

Efeito do tratamento quimioterápico na ação da proteína quinase dependente de RNA nos sistemas nociceptivo e muscular / Andrea Maia Carvalho; orientador Guilherme Araújo Lucas. -- São Paulo, 2017.

80 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2017.

1. PKR. 2. Cisplatina. 3. Dor Neuropática. 4. Mitocondriopatia . 5. Músculo esquelético. I. de Araújo Lucas, Guilherme, orient. II. Título.

CARVALHO, A.M. Efeito do tratamento quimioterápico na ação da proteína quinase dependente de RNA nos sistemas nociceptivo e muscular. Dissertação apresentada ao Programa de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Guilherme de Araujo Lucas Instituição: USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: Eliane Comoli Instituição: USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: Heloisa Della Coletta Francescato Instituição: USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali Instituição: FUEM

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Á toda minha família pelo apoio, carinho e compreensão durante a elaboração deste trabalho, especialmente minha mãe Ângela Maria Maia, pelo infindável estímulo e amor sem limites

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Guilherme Araújo Lucas, pela oportunidade, confiança, incentivo, cuidado e atenção durante todo o processo de orientação, meu eterno agradecimento.

À Maria Inês Nogueira, pela inspiração e apoio que contribuiu para o meu crescimento científico.

A Sonia Aparecida Zanon, por toda ajuda, parceria, profissionalismo e dedicação durante toda realização deste trabalho.

Ao Pedro Bonifácio, que me ajudou durante a coleta e tabulação dos dados deste trabalho, estando sempre ao meu lado durante esse projeto, obrigado por tornar o trajeto mais divertido.

Ao Jorge Martins, que me auxiliou em diversos momentos.

A toda equipe do Laboratório de Neurobiologia da dor do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela colaboração no desenvolvimento e análise desta pesquisa, obrigado pelo convívio diário e paciência.

A todos os amigos e colegas de pós-graduação por tornar os meus dias e horários de almoço mais alegres e por contribuir para o meu crescimento intelectual e pessoal.

À Heloísa D.C. Francescato pelo incansável incentivo e inspiração.

À Prof. Dra. Luciane Carla Alberici e Igor Hayaxibara Sampaio, por me encorajar a desvendar o belo caminho da respiração celular.

À Prof. Dra. Isis do Carmo Kettelhut e Juliano Machado por contribuir para o meu crescimento científico, intelectual no assunto de Endocrinologia e Controle do Metabolismo, obrigado Juliano por todos os dias trabalhados em conjunto.

Ao Cleber Eduardo Martins, que me auxiliou, acalmou com palavras doces e principalmente me amou em todo esse processo.

A todos os animais utilizados nessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação Faculdade de Medicina, pelo apoio financeiro fornecido para a realização das análises laboratoriais deste projeto.

“Eu sou aquela mulher a quem o tempo muito ensinou. Ensinou a amar a vida e não desistir da luta, recomeçar na derrota, renunciar as palavras e pensamentos negativos. Acreditar nos valores humanos e ser otimista.”

(Cora Coralina)

RESUMO

CARVALHO, A.M. *Efeito do tratamento quimioterápico na ação da proteína quinase dependente de RNA nos sistemas nociceptivo e muscular.* 2017. 89f Dissertação (Mestrado) - Programa de Neurociências e Comportamento, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A dor associada ao câncer pode ser causada não somente pelos efeitos diretos ou indiretos da patologia primária, mas também pelo tratamento quimioterápico. A Cisplatina é um dos medicamentos anti-neoplásicos mais efetivos e mais comumente usados no tratamento de tumores sólidos. Entretanto, um de seus principais efeitos colaterais é a neurotoxicidade periférica. Os mecanismos celulares e moleculares da dor crônica induzida por quimioterápico são ainda bastante obscuros. Investigamos o papel da proteína quinase dependente de RNA (PKR) nos diferentes mecanismos neurobiológicos associados à dor crônica induzida pelo quimioterápico Cisplatina. O presente estudo avaliou: (1) O desenvolvimento de alodínia mecânica e hipernocicepção térmica em camundongos PKR-/- e PKR+/+ submetidos à administração do quimioterápico Cisplatina; (2) O estado de fosforilação das MAPKs (Erk1,2, p38 e JNK/SAP) e o fator de transcrição STAT-3 nas células do gânglio da raiz dorsal de animais tratados com Cisplatina; (3) Alterações na resistência e força muscular dos camundongos PKR-/- e PKR+/+ submetidos a administração do quimioterápico Cisplatina; (4) A proteólise muscular em músculos EDL (glicolíticos) e *soleus* (oxidativos) de camundongos PKR-/- e PKR+/+ após tratamento com Cisplatina (5) A síntese proteica através de Western Blot das proteínas Akt, FoxO 1 e FoxO 4, S6k1 e a S6 em células C2C12 analisando temporalmente o efeito da Cisplatina (6h, 12h e 24h); (6) O estresse oxidativo mitocondrial em células do gânglio da raiz dorsal e do músculo *Soleus* de camundongos PKR-/- e PKR+/+ após tratamento com Cisplatina. Os resultados obtidos foram: (1) Que com o tratamento com cisplatina produziu hipernocicepção térmica e alodínia mecânica nos animais PKR+/+; (2) A reduz da fosforilação do p38 não justifica o quadro de hipernocicepção e a hipernocicepção pode ocorrer a partir do aumento da fosforilação de STAT 3; (3) Animais que não tem a PKR são menos vulneráveis à

ação deletéria da cisplatina sobre o músculo pois todos os testes comportamentais para atividade motora; (4) Não houve diferença na proteólise total mas sim na síntese proteica em animais PKR tratados com cisplatina; (5) Há alteração na via Akt quando analisa temporalmente a ação da cisplatina; (6) animais PKR -/- apresentaram índices mais altos da respiração mitocondrial comparados aos PKR +/+. Este estudo combinou métodos de biologia celular e molecular com paradigmas comportamentais a fim de investigar os possíveis mecanismos de ação da PKR no desenvolvimento de hipersensibilidade sensorial após o tratamento com quimioterápico. Os resultados deste trabalho devem evidenciar novos mecanismos neurobiológicos que contribuam para o entendimento da fisiopatologia da dor crônica de origem neurotóxica e apontar novas estratégias terapêuticas para o tratamento da dor crônica causada por quimioterapia.

Palavra-chave: 1. PKR 2. Cisplatina 3. Dor Neuropática 4. Mitocondriopatia

5. Músculo esquelético

ABSTRACT

CARVALHO, A.M. *Effect of chemotherapeutic treatment on the action of RNA-dependent protein kinase in the nociceptive and muscular systems.* 2017. 89f Dissertation (Master degree) - Program of Neurosciences and Behavior, Institute of Psychology, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

Pain associated with cancer can be caused by only direct or indirect products of the primary pathology, but also by chemotherapeutic treatment. Cisplatin is one of the most effective and most common anti-neoplastic drugs without the treatment of solid tumors. However, one of its major side effects is peripheral neurotoxicity. The cellular and molecular mechanisms of chronic pain induced by chemotherapy are still rather obscure. Investigators of role of RNA-dependent protein kinase (PKR) in the different neurobiological mechanisms associated with chronic pain induced by the chemotherapeutic Cisplatin. The present study evaluated: (1) the development of mechanical allodynia and thermal hypernociception in mice PKR - / - and PKR + / + submitted to chemotherapy Cisplatin; (2) The state of phosphorylation of the MAPKs (Erk1,2, p38 and JNK / SAP) and the transcription factor STAT-3 in the cells dorsal root ganglion of Cisplatin-treated animals; (3) Changes in muscle strength and strength of mice PKR - / - and PKR + / + submitted to the administration of the chemotherapeutic Cisplatin; (4) Muscle protein in EDL (glycolytic) and soleus (oxidative) muscles of mice PKR - / - and PKR + / + after treatment with Cisplatin (5) Western Blot Synthesis Protein of Akt, FoxO 1 and FoxO 4 S6k1 proteins and S6 in C2C12 cells by temporarily analyzing the effect of Cisplatin (6h, 12h and 24h); (6) Mitochondrial oxidative stress in dorsal root ganglion and Soleil muscle cells of PKR - / - and PKR + / + mice after treatment with Cisplatin. The results obtained were: (1) That with the treatment with cisplatin produced thermal hypernociception and mechanical allodynia in the animals PKR + / +; (2) The reduced phosphorylation of p38 does not justify the hyperencouragement and hypernociception can occur from increased STAT 3 phosphorylation; (3) Animals that do not have a PKR are less vulnerable to the deleterious action of cisplatin on muscle for all behavioral tests for motor activities; (4) There was no difference in total proteolysis but in protein

synthesis in PKR animals treated with cisplatin; (5) There is alteration in the Akt pathway when the action of cisplatin is temporarily analyzed; (6) Animals PKR - / - had higher mitochondrial respiration rates compared to PKR + / +. This study combined methods of cellular and molecular biology with behavioral paradigms to investigate the possible mechanisms of action of PKR in the development of sensory hypersensitivity after treatment with chemotherapy. The results of this program are mandatory, which are responsible for the development of medicines for health and human health.

Key words: 1. PKR 2. Cisplatin 3. Neuropathic pain 4. Mitochondriopathy

5. Skeletal muscle

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de transdução da proteína PKR 23
Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo da ação da cisplatina. Adaptado de BARNES, 2004. 25
Figura 3 - Ativação da via de sinalização da PI3K/Akt, induz aumento da fosforilação dos Fatores de transcrição FoxO e mTor. (Adaptado de Wang, 2014 (Wang et al., 2014)) 31
Figura 4 -Cruzamento C57Bl/6JxSV129 33
Figura 5- Representação do teste Von Frey 35
Figura 6 - Aparato do teste Hargreaves 36
Figura 7 - Desenho ilustrativo do aparato utilizado para realizar o teste RotaRod.... 37
Figura 8 - Oxygraph-2k, Oroboros Instruments 41
Figura 9 - Representação do gráfico de ensaio de Oxygraph mostrando o tempo em que as mitocôndrias do músculo soleus foram adicionadas à câmara de reação, seguido pela adição sequencial de succinato, ADP + Pi, oligomicina e três doses de CCCP. A linha azul refere-se à diminuição da concentração de oxigênio (eixo vertical direito) dentro da câmara e a linha vermelha ao fluxo de oxigênio (eixo vertical esquerdo), indicando o oxigênio consumido pela amostra de tecido. O eixo horizontal representa a escala de tempo de cada experimento de 80 minutos. 42
Figura 10 - Valores observados para a latência ao teste de Hargreaves (A) e limiar no teste de Von Frey (B) em animais PKR+/+ e PKR -/-, tratados com cisplatina e solução salina, no momento basal, durante a aplicação de quatro semanas e por cinco semanas após o fim do tratamento. Animais que receberam solução veículo (salina) apresentam valores de latência maiores, quando comparados àqueles que receberam o quimioterápico Cisplatina, por sua vez animais PKR -/- apresentam valores absolutos maiores, quando comparados aos seus controles, além disso esses animais apresentam maior tolerância ao teste mecânico quando comparados àqueles PKR +/+. A cisplatina tornou os animais mais sensíveis, mesmo à filamentos de Von Frey mais finos quando comparados aos animais que receberam apenas solução veículo (***p<0.0001, ** p<0.001, * p<0.01em relação ao grupo PKR -/- que recebeu cisplatina, utilizando ANOVA de duas vias seguido de pós-testes de Bonferroni, n=12-15/grupo). 45
Figura 11- Perfis de fosforilação de (A) p38, (B) JNK e (C) ERK1,2 (D) STAT3 expressos como porcentagem da fração entre a proteína e a β-actina em DRG de animais C57bl/6 tratados com Cisplatina e salina, retirada do tecido após 30 min da administração i.p. de 0.2 mg/kg do PKRi ou seu veículo. Resultados expressos em média ± E.P.M. (*p<0.05 em relação ao grupo CTL, utilizando teste t de Student não pareado, n=5-8/grupo). 47
Figura 12 - Dados em Δ da modificação do peso corporal em animais PKR-/- e PKR +/+ tratados com o quimioterápico Cisplatina e com seu veículo (salina)..... 48

Figura 13- Valores observados para a resistência muscular no teste RotaRod (A) valores observados da fadiga muscular (B) e porcentagem da força muscular no teste o Grip-Strength Meter (C) em animais PKR+/+ e PKR -/-, tratados com cisplatina. Foi analisado o valor basal, o tempo durante a aplicação de quatro semanas e por quatro semanas após o fim do tratamento. Animais PKR +/+ apresentaram valores menores, quando comparados àqueles que receberam os PKR -/- (** p<0.001, * p<0.01, relação entre o grupo PKR +/+ e grupo PKR -/- que receberam cisplatina, utilizando ANOVA de duas vias seguido de pós-testes de Bonferroni, n=12-15/grupo).....49
Figura 14- (A)Taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas do músculo soleus de camundongos PKR +/+ tratados com cisplatina; PKR +/+ tratados com salina; PKR -/- tratados com cisplatina; PKR -/- tratados com salina. Diferença estatística com P < 0,05. A P < 0,05 vs controle. N = 5-8. a= diferença entre PKR-/- e PKR +/+ controle, b= diferença entre PKR -/- controle e PKR +/+ cisplatina c= diferença PKR -/- controle e cisplatina . (B) Taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas do gânglio da raiz dorsal de camundongos PKR +/+ tratados com cisplatina; PKR +/+ tratados com salina; PKR -/- tratados com cisplatina; PKR -/- tratados com salina. Diferença estatística com P < 0,05. A P < 0,05 vs controle. N = 5-8 a= diferença entre PKR-/- e PKR +/+ controle, b= diferença entre PKR -/- controle e PKR +/+ cisplatina c= diferença PKR -/- controle e cisplatina. 51
Figura 15 - Valores avaliados da massa corporal a partir do músculo tibial anterior de animais PKR-/- tratados com salina e cisplatina e PKR+/+ tratados com salina e cisplatina (A) Valores observados do marcador para síntese proteica, a proteína S6 (B) e Valores referente a proteólise muscular (C) em animais PKR+/+ e PKR -/-, tratados com cisplatina. Foi analisado músculos de animais dos quatros grupos citados, após 48h do final do tratamento com cisplatina ou salina. Animais PKR +/+ apresentaram valores menores, quando comparados àqueles dos PKR -/- (* p<0.01, relação entre o grupo PKR +/+ salina e todos os outros grupo que receberam cisplatina e salina, # p<0.01 relação do grupo PKR -/- com o grupo PKR -/-, utilizando ANOVA de duas vias seguido de pós-testes de Bonferroni, n=6-8/grupo).....53
Figura 16: Efeitos in vitro em células mioblastos C2C12, avaliando temporalmente o efeito da Cisplatina em níveis de fosforilação de vários substratos da Akt-(Ser473), a técnica Western Blot (A) e posteriormente sua quantificação e analise (B). Os valores são expressos como média±EPM de 4-8 músculos por grupo em relação aos valores controle considerados como 100%, (*) p<0,05 vs. 54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Distribuição temporal dos experimentos.....34

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	*V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*
AA	Antimicina
ADP	Adenosina Difosfato
ADP/O	Eficiência da fosforilação pelo ADP
ANOVA	Análise de Variância
ATF-3	*Cyclic AMP-dependent transcription factor 3*
ATF-4	*Cyclic AMP-dependent transcription factor 4*
BDNF	*Brain derived neurotrophic factor*
C57Bl/6	Linhagem de camundongo
CaMKII	*Ca2+-calmodulin stimulated protein kinase II*
CCCP	*Hidrazona protonophore carbonil cianeto the m-clorofenilo*
CFA	*Complete Freund's adjuvant*
CR	Controle Respiratório (Estado III/ Estado IV)
CREB	*cAMP response element-binding protein*
CTL	Controle
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
DRG	*Dorsal root glanglion*
ECL	*Enhanced chemiluminescence*
EDL	Músculo extensor longo dos dedos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
Eif2α	*Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1*
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
Erk1,2	*Extracellular regulated protein kinases*
Fig	Figura
fosfo-PKR	Proteína quinase fosforilada dependente de RNA
FoxO	*Forkhead box protein*
GDNF	*Glial derived neurotrophic factor*
GFAP	*Glial fibrillary acidic protein*
Iba 1	*Ionized calcium-binding adapter molecule 1*
IFN-α	*Interferon type α*
IKK	*IkB kinase*

IKKα	*IkB kinase alpha*
IKKβ	*IkB kinase beta*
IL-1	Interleucina-1
I.P.	Injeção via intraperitoneal
IRF-1	*Interferon regulatory factor 1*
JNK/SAP	*Jun N-terminus kinase*
L3	Quinta vértebra lombar
L6	Sexta vértebra lombar
LPS	*Lipopolysaccharide*
MAFbx	*Muscle atrophy F-box*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinases*
MiRos	Meio de respiração (Mitomed R05)
Mstn	Miostatina
mTOR	*Mechanistic target of rapamycin*
MuRF1	*Muscle RING-finger protein-1*
Nav1.3	Canal de Sódio
NEC	Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento, Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
NFκB	*Nuclear factor-kB*
NGF	*Nerve growth factor*
NMDA	*N-metil D-Aspartato*
Olig	Oligomicina
p38	*Mitogen-activated protein kinase*
p44/42	*Extracellular regulated protein kinase*
PACT	*Protein Activator of the interferon-induced protein kinase*
PCR	Proteína C reativa
PDGF	*Platelet-derived gowth factor*
PKR	Proteína quinase dependente de RNA
PKR-/-	Animal modificado geneticamente que não possui a proteína PKR
PKR+/+	Animal modificado genéticamente que possui a proteína PKR
PKRi	Inibidor da proteína PKR

PLCγ-1	*Phospholipase C gamma*
PP2A	*Protein phosphatase 2*
Pt	Platina
RAX	*Protein Activator of the interferon-induced protein kinase in murine*
RNA	*Ribonucleic acid*
RNAds	*Ribonucleic acid Double tape*
RNAm	Messenger RNA
Rot	Rotenona
SC	*Dorsal column*
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SS	Sem Substrato
STAT-3	*Signal transducer and activator of transcription 3*
Sub	Substrato
Suc	Succinato
TLR	*Toll-like receptor*
TNF- α	*Tumor necrosis factor alpha*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 ATIVAÇÃO DA PKR 21
1.2 REGULAÇÃO DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA PKR 22
1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DA CISPLATINA 23
1.4 CISPLATINA E NEUROPATIA PERIFÉRICA 26
1.5 PLASTICIDADE NEURAL INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO PERSISTENTE DO SISTEMA NOCICEPTIVO 26
1.6 CISPLATINA E PROTEÓLISE MUSCULAR 28
1.6.1 Sistema proteolítico autofágico–lisossomal 28
1.6.2 Sistema proteolítico dependente de Ca^{+2} 29
1.6.3 Sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma 29
1.6.4. Sinalização intracelular de controle do metabolismo proteico em músculo. 30
1.7 JUSTIFICATIVA 31
2 OBJETIVOS 32
2.1 OBJETIVO GERAL 32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
3 MATERIAL E MÉTODOS. 33
3.1 ANIMAIS 33
3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO 34
3.3 INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DO PKRI 34
3.4 COMPORTAMENTO 35
3.4.1 Teste de sensibilidade mecânica para monitoramento de alodínia 35
3.4.2 Teste para monitoramento de hipernocicepção 36
3.4.3 Teste para atividade motora e força muscular 37
3.4.4 Teste para medir a força muscular 38
3.5 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS E DE SEUS RESÍDUOS FOSFORILADOS. 38
3.6 MEDIÇÕES DE PROTEÓLISE E ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS GLOBAIS IN VITRO 40
3.7 MEDIÇÕES DE PROTEÓLISE E ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS GLOBAIS IN VITRO 40
3.8 CULTURA DE CÉLULAS C2C12 40
3.9 MEDIDAS DO CONSUMO DE OXIGÊNIO 41
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 42
4 RESULTADOS 44

4.1 A CISPLATINA PROVOCA ALTERAÇÕES NA SENSIBILIDADE DOLOROSA EM CAMUNDONGOS PKR+/+ E PKR-/-. 44
4.2 EFEITOS DA CISPLATINA APLICADA DE FORMA SISTÊMICA NA FOSFORILAÇÃO DE P38, JNK E ERK1,2. E NO FATOR DE TRANSCRIÇÃO STAT3. 46
4.3 MEDIDA DO PESO CORPORAL E TESTES PARA MEDIR FORÇA E RESISTÊNCIA MUSCULAR 47
4.4 ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS EM MÚSCULO SOLEUS E GÂNGLIOS DA RAIZ DORSAL DE ANIMAIS PKR-/- E PKR +/+ TRATADOS COM CISPLATINA. 50
4.5 TRATAMENTO EM C2C12, SÍNTESE PROTEICA E PROTEÓLISE MUSCULAR EM CAMUNDONGOS PKR-/- E PKR +/+ TRATADOS COM CISPLATINA E PKR-/- E PKR +/+ TRATADOS COM SALINA 52

5 DISCUSSÃO.....56

6 CONCLUSÃO 64

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 65

ANEXO.....80

APROVAÇÃO DO PROJETO “AÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE RNA NA NEUROBIOLOGIA DA DOR CRÔNICA PROVOCADA PELO TRATAMENTO COM QUIMIOTERÁPICO” COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA DO FMRP-USP 80

1 INTRODUÇÃO

A proteína-quinase ativada por RNA de fita dupla (PKR) é reconhecida como uma quinase serina/treonina (foi caracterizada em resposta a sinais de estresse específicos), ativada pela autofosforilação e conduz à fosforilação de eIF-2α, prejudicando sua atividade, o que resulta na inibição da síntese protéica e indução da apoptose (Chaplan *et al.*, 1997; Cummins e Waxman, 1997; Malmberg e Basbaum, 1998; Dickinson *et al.*, 2003; Cata *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2006; Hayward, 2006). Além de sua função regulatória na tradução de proteínas, a PKR tem um papel na transdução de sinais e no controle transcricional através do inibidor das vias κB (IkB) / fator nuclear κB (NF-kB)(Gil *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2004). A PKR está envolvida em várias vias que envolvem uma série de fatores de transcrição que regulam a expressão de múltiplos genes, como o fator regulador do interferon 1 (IRF-1), o fator *Activating transcription factor 4* (ATF4) e o fator *cAMP response element-binding protein* (CREB), transdutores de sinal e ativadores de fatores de transcrição (Williams, 2001; Garcia *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012). A enzima possui dois domínios bem caracterizados consistindo de um segmento terminal regulatório NH2, onde se encontram as sequências de ligação de RNAd, e o domínio catalítico serina/treonina na terminação carboxílica (Forman, 1990a; b; Dickinson *et al.*, 2003). Recentemente, entretanto, foi relatado que PKR também fosforila sítios de tirosina e que este efeito influencia, tanto a ligação com RNAds, quanto a autofosforilação e a ativação da proteína eIF-2 (Hokfelt *et al.*, 1994; Hayward, 2006).

Ainda é aceito que os principais ativadores naturais de PKR são produzidos por células infectadas por vírus, que produzem e liberam RNAds como produto da replicação viral (Hokfelt *et al.*, 1994; Hayward, 2006). Por esta razão, reconhece-se que esta enzima desempenhe um papel essencial na resposta imune inata à infecções virais (Hokfelt *et al.*, 1994; Hayward, 2006). Entretanto, esta quinase é também fosforilada em resposta ao RNAds de origem celular ou mesmo sintético (Brown *et al.*, 1991; Hokfelt *et al.*, 1994; Akerley, 2000; Sekellick *et al.*, 2000). Na última década, aprendemos que além de mediar um papel crítico em resposta a RNAds, agindo como um sensor de infecções virais, PKR é ativada por fatores tão diversos quanto estímulos pró-inflamatórios, fatores de crescimento, citocinas e estresse oxidativo (Cavaletti *et al.*, 1995; Ma e Quirion, 2001; Malcangio e

Lessmann, 2003; Hayward, 2006). Desta forma, a atividade de PKR encontra-se, hoje, associada à regulação de funções celulares tão diferentes como diferenciação, transcrição, apoptose e ciclo celular (Mcguire *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1999; Mannion *et al.*, 1999; Ma e Quirion, 2001; Malcangio e Lessmann, 2003; Hayward, 2006).

1.1 ATIVAÇÃO DA PKR

A fosforilação de PKR ocorre não somente por estímulos de origem extracelular, mas também pela ação da proteína ativadora de PKR, localizada no citosol (Millan, 1999; Mantyh *et al.*, 2002; Marchand *et al.*, 2005).

A ativação de PKR por estímulos extracelulares ocorre, principalmente, pelos receptores da família TLR (*Toll-like receptor*) através da ligação com RNAds, lipopolisacarídeo (LPS), e peptídeoglicanos (Mannion *et al.*, 1999; Miletic, Hanson e Miletic, 2004; Miletic, Hanson, Savagian*, et al.*, 2004) desempenhando, assim, uma ação preponderante na ativação da resposta imune inata (Mcguire *et al.*, 1997; Mantyh *et al.*, 2002; Miletic *et al.*, 2002; Miyabe e Miletic, 2005). Sabemos, hoje, que PKR sinaliza também em resposta, fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF, *platelet-derived gowth factor*) e citocinas como o interferon, interleucina-1 (IL-1) e o Fator de necrose tumoral-α (TNF- α, tumor necrosis factor) (Mcguire *et al.*, 1997; Mantyh *et al.*, 2002; Miletic *et al.*, 2002; Miyabe e Miletic, 2005).

Em condições de estresse fosforilação de PKR pode ocorrer também através da ação da proteína citosólica PACT (*Protein Activator of the interferon-induced protein kinase*) (Millan, 1999; Marchand *et al.*, 2005). Estas proteínas são capazes de induzir a autofosforilação de PKR de forma independente de RNAds, sendo que o aumento transitório da expressão de PACT em células de mamíferos foi capaz de aumentar os níveis de autofosforilação de PKR e induzir a fosforilação do fator de iniciação da tradução eIF2α inibição da síntese protéica e apoptose (Millan, 1999; Marchand *et al.*, 2005; Vaughn *et al.*, 2015). Em camundongos, também foi isolada uma proteína homóloga de PACT, conhecida como ativador X de PKR (RAX) (Lipton *et al.*, 1989; Honore *et al.*, 2000; Mantyh *et al.*, 2002). De maneira semelhante a PACT, situações de estresse celular induzem uma rápida fosforilação de PKR através da ativação de RAX (Lipton *et al.*, 1989; Mantyh *et al.*, 2002).

1.2 REGULAÇÃO DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA PKR

Diversas vias de transdução são afetadas a partir da ativação de PKR (Fig. 1). Um dos primeiros alvos descritos para PKR foi o fator de transcrição IRF-1, um supressor tumoral ausente em pacientes com leucemia (Forman, 1990b; Cummins e Waxman, 1997; Mannion *et al.*, 1999; Miletic, Hanson e Miletic, 2004; Miyabe e Miletic, 2005; Hayward, 2006) e que, aparentemente, medeia mecanismos apoptóticos desencadeados por PKR (Malcangio e Lessmann, 2003). Outro alvo são proteínas da família STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), proteínas envolvidas em diversas funções biológicas e que participam ativamente das vias de sinalização intracelular desencadeadas por interferons e outras citocinas (Pace *et al.*, 1997; Miletic *et al.*, 2002; Miletic, Hanson e Miletic, 2004; Miletic, Hanson, Savagian*, et al.*, 2004).

A associação entre PKR e STAT pode, também, ocorrer de forma indireta, sem uma interação direta substrato-quinase. Este parece ser o caso de STAT-1 (Scholz e Woolf, 2002), cujo estado de fosforilação permanece inalterado pela ação exclusiva de PKR (Lo *et al.*, 1999; Marchand *et al.*, 2005; Hayward, 2006). Neste caso, a PKR controlaria uma cascata de quinases na qual ERK (*Extracellular regulated protein kinases*) seria a responsável pela fosforilação de STAT-1. Outro importante alvo de PKR são as MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), quinases de serina/treonina que regulam diversos eventos celulares (Tsuda *et al.*, 2005). Em mamíferos, as MAPKs estão classificadas em várias famílias, sendo as principais ERK, p38 e JNK (Tsuda *et al.*, 2005). Tanto p38, quanto JNK, são dependentes da fosforilação de PKR para uma efetiva resposta intracelular desencadeada pela ação de LPS ou citocinas do tipo de IFN-α, IL-1 ou TNF-α (Ashburn e Lipman, 1993; Hokfelt *et al.*, 1994; Omana-Zapata *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1999; Hayward, 2006).

A proteína ATF-3, um dos membros da família CREB (*cAMP response element-binding protein*) de fatores de transcrição, também é um dos alvos de ação de PKR (Hokfelt *et al.*, 1994; Woolf e Salter, 2000; Scholz e Woolf, 2002). ATF-3 é expressa em quantidades muito baixas sob condições fisiológicas e sua ativação está associada a mecanismos de lesão celular (Hokfelt *et al.*, 1994; Woolf e Salter, 2000). Por fim, o NFκB, um fator de transcrição que controla a expressão de genes associados com respostas imune e inflamatória, diferenciação celular e apoptose,

representa um dos alvos mais conhecidos de PKR (Lo *et al.*, 1999; Lever *et al.*, 2003; Zhuang *et al.*, 2005; Zieglgansberger *et al.*, 2005). O principal mecanismo de regulação da atividade de NFκB é sua interação com moléculas inibitórias da família IKKB (Zhuang *et al.*, 2005). Estas proteínas são fosforiladas pelo complexo IKK, que as degrada, permitindo, assim, a translocação de NFκB para o núcleo, onde irá regular a transcrição de diversos genes (Lever *et al.*, 2003).

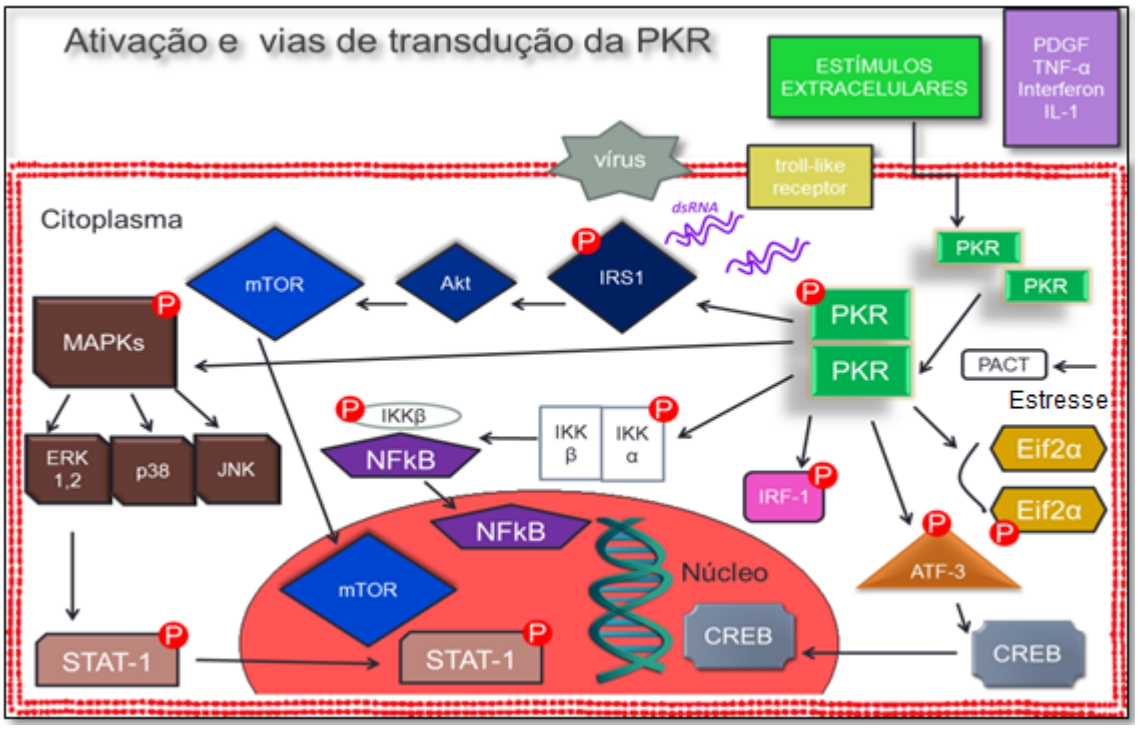


Figura 1 - Vias de transdução da proteína PKR

Neste trabalho investigaremos alguns dos possíveis efeitos do tratamento com o quimioterápico cisplatina sobre os mecanismos de ação de PKR.

1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DA CISPLATINA

A cisplatina (cis -diamminedichloroplatinum II) é um complexo inorgânico composto por um átomo de platina rodeado por grupos cloreto e amina na posição cis (Chiorazzi *et al.*, 2015). Ela é dos medicamentos anticancerígenos mais utilizados de tumores sólidos, incluindo câncer de cabeça e pescoço, do endométrio, esófago, pulmão, melanoma maligno, carcinoma adrenocortical, câncer de ovário,

mama, colo do útero e da bexiga. A cisplatina atua na célula tumoral através de mecanismos como danos de DNA e produção de espécies reativas de oxigênio, que levam à morte celular por apoptose (Li *et al.*, 2004; Wang e Lippard, 2005). A morte celular também pode ocorrer por necrose quando a célula é exposta a altas concentrações de platina (Chaudhry *et al.*, 1994; Wang e Lippard, 2005; Carozzi *et al.*, 2015).

A administração clínica de cisplatina é limitada pelos seus efeitos secundários, que incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade do trato gastrointestinal e toxicidade da medula óssea (mielossupressão) (Saleh e El-Demerdash, 2005; Carozzi *et al.*, 2015). Participa da nefrotoxicidade pode ser controlada com hidratação e administração de manitol, diuréticos ou acetozolamida e tiol (Bates *et al.*, 2002).

Os mecanismos de neurotoxicidade são um dos aspectos menos conhecidos, mas se evidenciam clinicamente por dor persistente, parestesia, ataxia sensorial, desmielinização e degeneração axonal dos neurônios periféricos (Cavaletti *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1999; Carozzi *et al.*, 2015). Os neurônios do gânglios da raiz dorsal são considerados os principais alvos de ação da cisplatina, podendo causar danos no DNA nuclear e morte celular (Cavaletti *et al.*, 1995; Carozzi *et al.*, 2015) e (Huang *et al.*, 2010). Embora o efeito da cisplatina em danos no DNA nuclear tenha sido amplamente investigado, sua interação com DNA mitocondrial foi apenas recentemente investigado (Podratz *et al.*, 2011). A cisplatina forma adutos com o DNA mitocondrial a uma taxa semelhante ao DNA nuclear e estes adutos promovem a inibição da replicação de DNA mitocondrial, alteração da transcrição e anormalidades morfológicas dentro da mitocôndria de neurônios do gânglio da raiz dorsal (Podratz *et al.*, 2011) (Fig. 2).

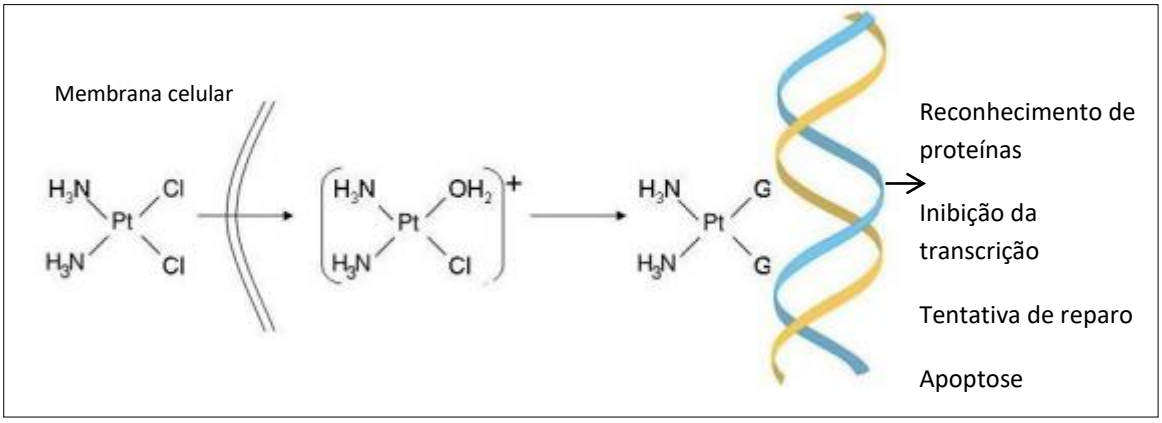


Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo da ação da cisplatina. Adaptado de BARNES, 2004.

Por sua vez, outros eventos ligados à atuação da Cisplatina devem ser levados em consideração. Existem grandes indícios de disfunções renais provocadas pelo acúmulo de cisplatina nas mitocôndrias existentes nos rins (Karasawa e Steyger, 2015; Zhu *et al.*, 2015), como resultado ocorre a desestabilização da função mitocondrial e elevação nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Karasawa e Steyger, 2015). A consequência final é a diminuição da captação de cálcio pela mitocôndria e liberação de fatores pró-apoptóticos (Podratz *et al.*, 2011). Os canalículos renais ficam inutilizados, sobretudo os túbulos cortorcidos distais, apresentam grande concentração de mitocôndrias, culminando em um quadro de falência renal (Ozkok e Edelstein, 2014; Santos Na 2017).

Diversos estudos sugerem a grande participação da cisplatina na gênese dos processos inflamatórios que comprometem não somente a função renal, mas também demais tecidos, como componentes nervosos e articulações, resultando em dores que perduram mesmo após o tratamento quimioterápico (Pan *et al.*, 2015). O fator de transcrição nuclear (NF-kB) pode ser ativado e translocado para o núcleo devido a utilização de cisplatina (esta induz a degradação da proteína inibidora IκBα)(Gil *et al.*, 2000). Já no núcleo, NF-kB viabiliza a transcrição de genes codificadores de mediadores inflamatórios (Miller *et al.*, 2010). Dessa forma ocorre o aumento da expressão do fator de necrose tumoral (TNF-α), citocina de grande destaque na inflamação sistêmica. TNF-α provoca danos aos tecidos diretamente por meio do receptor de TNF tipo 1 (TNFR1) ou indiretamente através de uma

resposta inflamatória considerável por meio do receptor de TNF tipo 2 (TNFR2) (Ramesh e Reeves, 2003).

TNF- α também é responsável pela ativação de um grande número de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas-1,4,6 (IL-1β, IL-4, IL-6), fator de crescimento de transformação (TGF-β 1) e a proteína quimiotáxica para monócitos (MCP-1)(Honore *et al.*, 2000). Moléculas de adesão também podem ter suas expressões induzidas pela atuação de TNF-α, incluindo a molécula de adesão intercelular (ICAM-1), molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1) e selectina-E. Dessa forma células inflamatórias são atraídas para diferentes tecidos, provocando aumento de sensibilidade local, dores e desconforto nos pacientes afetados (Hartmann e Lipp, 2003; Miller *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2013).

1.4 CISPLATINA E NEUROPATIA PERIFÉRICA

Uma complicação comum da quimioterapia é a neurotoxicidade que muitas vezes se manifesta como neuropatia periférica. Muitos medicamentos contra o câncer podem causar neuropatia periférica, incluindo a Cisplatina, sendo que a incidência pode ser de até 90%.(Windebank e Grisold, 2008). A neuropatia periférica está intimamente relacionado com a dose cumulativa total de fármaco para a cisplatina (Gregg *et al.*, 1992). A neuropatia sensorial é predominantemente diagnosticada após queixas iniciais de dormência ou parestesias nas partes distais das extremidades (Marchal *et al.*, 2014). A perda de função sensorial de fibras com ataxia sensorial é comum. A ototoxicidade pode resultar em perda auditiva e vertigens (Hyppolito *et al.*, 2005). Embora a neuropatia periférica induzida por quimioterapia seja um efeito colateral que limite a dose da quimioterapia, o seu curso clínico é semelhante a outras neuropatias tóxicas.

1.5 PLASTICIDADE NEURAL INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO PERSISTENTE DO SISTEMA NOCICEPTIVO

Há apenas duas décadas, a investigação de mediadores ou moduladores da dor restringia-se, principalmente, à ação periférica de prostaglandina e bradicinina

(Lo *et al.*, 1999; Mannion *et al.*, 1999; Honore *et al.*, 2000; Marchand *et al.*, 2005). Estes fatores são produzidos pela lesão tecidual ou inflamação e já eram reconhecidos como responsáveis pela ativação e sensibilização de neurônios nociceptivos periféricos (Scholz e Woolf, 2002). Algumas outras moléculas começavam a ser reconhecidas como mediadores centrais da dor, em particular, o glutamato e a substância P, liberados por terminais nociceptivos centrais. Iniciava-se, também, o reconhecimento de que o óxido nítrico era produzido por neurônios da coluna dorsal da medula espinal e de que agiria como um potencializador da excitabilidade dos circuitos centrais de transmissão da dor (Lo *et al.*, 1999; Mannion *et al.*, 1999; Mantyh *et al.*, 2002; Marchand *et al.*, 2005).

Na última década, entretanto, um número crescente de mediadores e moduladores continua sendo descrito nos circuitos de transmissão da dor, evidenciando a complexidade do processamento da informação nociceptiva, tanto no neurônio periférico primário, quanto em neurônios centrais espinais e supra-espinais (Millan, 1999). Igualmente relevante, foi o reconhecimento de que estes novos mediadores eram produzidos e liberados também por células não neuronais, predominantemente células da glia e do sistema imune (Millan, 1999; Zimmermann, 2001; Mantyh *et al.*, 2002; Ji e Strichartz, 2004; Marchand *et al.*, 2005; Hayward, 2006; Tsuda *et al.*, 2017). Modelos experimentais têm revelado, ainda, que a dor crônica de origem inflamatória é consequência, principalmente, de mudanças neuroquímicas, fisiológicas e morfológicas nos neurônios sensoriais, tanto periféricos, quanto centrais, alterando, dramaticamente, suas características fenotípicas e sua atividade sináptica de forma crônica (Hokfelt *et al.*, 1994; Ji e Strichartz, 2004; Tsuda *et al.*, 2005; Ueda, 2006).

Estas mudanças determinam uma redução da atividade inibitória e um aumento dos eventos excitatórios nos neurônios do gânglio da raiz dorsal e da coluna dorsal da medula espinal, reduzindo seus níveis de excitabilidade, resultando na hipersensibilização de neurônios sensoriais (Millan, 1999; Moore *et al.*, 2000; Lever *et al.*, 2003; Malcangio e Lessmann, 2003) e no aparecimento de uma forma de dor recorrente ou permanente (Lai *et al.*, 2001; Zimmermann, 2001; Scholz e Woolf, 2002; Dickinson *et al.*, 2003; Marchand *et al.*, 2005; Zieglgansberger *et al.*, 2005).

1.6 CISPLATINA E PROTEÓLISE MUSCULAR

A fadiga é o efeito colateral mais comum da quimioterapia. No entanto, os mecanismos de "fadiga muscular" induzidos por drogas anticancerígenas, como a cisplatina, não são totalmente compreendidos. (Patrick *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2014).

O *turnover* de proteínas, acontece continuamente no músculo esquelético, pode ocorrer por meio de três mecanismos intracelulares. São eles: o sistema proteolítico dependente de cálcio (Ca^{+2}), o sistema autofágico lisossomal e o sistema dependente de ubiquitina-porteassoma (Goll *et al.*, 2003; Wendt *et al.*, 2004). Estes sistemas devem atuar de modo equilibrado, pois muitos eventos fisiológicos dependem dessa homeostasia, como por exemplo: a reciclagem de proteínas e receptores de membrana, crescimento e diferenciação celular, fornecimento de aminoácidos para a gliconeogênese, além de impedir que proteínas mal formadas permaneçam no ambiente celular (Lecker *et al.*, 2006). A reciclagem de proteínas é um importante evento fisiológico para a homeostase corporal e pode ocorrer por diferentes vias (Goll *et al.*, 2003; Zetter e Mangold, 2005).

1.6.1 Sistema proteolítico autofágico–lisossomal

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas que possuem a capacidade de degradar proteínas devido à presença, em seu interior, de enzimas conhecidas como catepsinas. Estão presentes, também, um grande número de hidrolases ácidas. Juntas essas enzimas degradam proteínas citoplasmáticas e extracelulares (endocidatas por vesículas) (Tanida *et al.*, 2004). Para a musculatura esquelética, a autofagia mediada por vesículas merece especial atenção.

O processo de autofagia inicia-se por meio da formação de vesículas de dupla membrana que englobam o substrato a ser degradado e entregam para os lisossomos. Algumas moléculas são indispensáveis para que essa vesícula possa se formar adequadamente. Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) de classe III, beclina e os genes autofágicos (Atg) são, por exemplo, componentes necessários para a formação da estrutura do pré-fagossomo, além de LC3 (*microtubule associated*

protein light chain 3) que passa por uma série de modificações pós-traducionais para que possa atuar na formação e isolamento do autofagossomo (Bechet *et al.*, 2005; Malicdan *et al.*, 2008). O sistema autofágico-lisossomal está diretamente relacionado com à atrofia em células musculares (Mammucari *et al.*, 2007). Dessa forma os genes do sistema autogágico-lsossomal desempenham um importante papel em eventos relacionados com a degradação de proteínas em musculo estriado esquelético e podem ser utilizados como marcadores da autofagia tecidual (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007).

1.6.2 Sistema proteolítico dependente de Ca^{+2}

Este sistema, inicialmente descrito por Goll e colaboradores (Goll *et al.*, 2003) em neurônios de ratos, é composto por cisteína-proteases conhecidas como calpaínas. Este sistema já foi encontrado na proteólise de músculo esquelético e cardíaco (Goll *et al.*, 2003).

A musculatura esquelética possuí duas classes de calpaínas: µ- e m-calpaínas. Dependendo da concentração de Ca^{+2} elas podem se tornar ativas. O Ca^{+2} liga-se ao domínio regulatório (IV), ocorre a autólise da extremidade N-terminal e o domínio catalítico é, então, exposto. Dessa forma µ- e m-calpaínas podem atuar na proteólise do músculo esquelético (Goll *et al.*, 2003; Wendt *et al.*, 2004).

1.6.3 Sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma

Este sistema é o responsável pela degradação de grande parte das proteínas miofibrilares. Dessa forma é o principal sistema proteolítico envolvido na instalação e desenvolvimento da atrofia muscular (Jackman e Kandarian, 2004; Urso, 2009).

São duas as etapas envolvidas com a proteólise nesse processo. A primeira consiste na marcação, por ubiquitina, da proteína que deve ser degradada (ubiquitinação). Para que isso ocorra, três enzimas são necessárias: E1 (ativadora de ubiquitina); E2 (carreadora de ubiquitina) e E3 (ubiquitina-ligase) (Jackman e Kandarian, 2004; Urso, 2009).

A próxima etapa consiste em adicionar múltiplas unidades de ubiquitina na proteína alvo. Para isso, a E3 confere a especificidade necessária para a ligação das

moléculas em um processo iniciado por E2. Após sua poliubiquitinação o substrato alvo pode, então, ser reconhecido e degradado pelo proteasssoma 26S (Jackman e Kandarian, 2004; Urso, 2009).

1.6.4.Sinalização intracelular de controle do metabolismo proteico em músculo.

PI3K/AKT

Hormônios anabólicos (e anti-catabólicos) como a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) podem atuar sobre a musculatura através de ligações aos seus receptores do tipo tirosina quinase, estes irão ativar a via da fosfatidilinositol 3-quinase de classe I (PI3K) e a *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1* (Akt). A Akt possui atividade serina/treonina quinase e é de grande importância no controle da massa muscular (Bodine, Stitt*, et al.*, 2001).
Quando há o aumento da fosforilação da Akt (forma ativada induzida por insulina ou IGF-1) pode ocorrer a ativação, por fosforilação de proteínas quinases envolvidas com a síntese proteica, como mTOR (*Mechanistic target of rapamycin*) e seu substrato p70S6K. A hiperexpressão da Akt pode promover hipertrofia e inibir a atrofia muscular (Bodine, Latres*, et al.*, 2001; Ersahin *et al.*, 2015).

Akt também inibe os fatores de transcrição FoxO (*forkhead box class o*) impedindo sua translocação para o núcleo e a transcrição de seus genes alvos (Fig.3). A FoxO regula a expressão de genes envolvidos com a atrofia e autofagia, como MuRf1 e atrogina-1 (Sandri *et al.*, 2004; Mammucari *et al.*, 2007). Assim sendo, acredita-se que os sistema de proteólise autofágico e dependente de ubiquitina/proteassoma estejam sob regulação de uma mesma via envolvendo Akt/FoxO (Mammucari *et al.*, 2007).

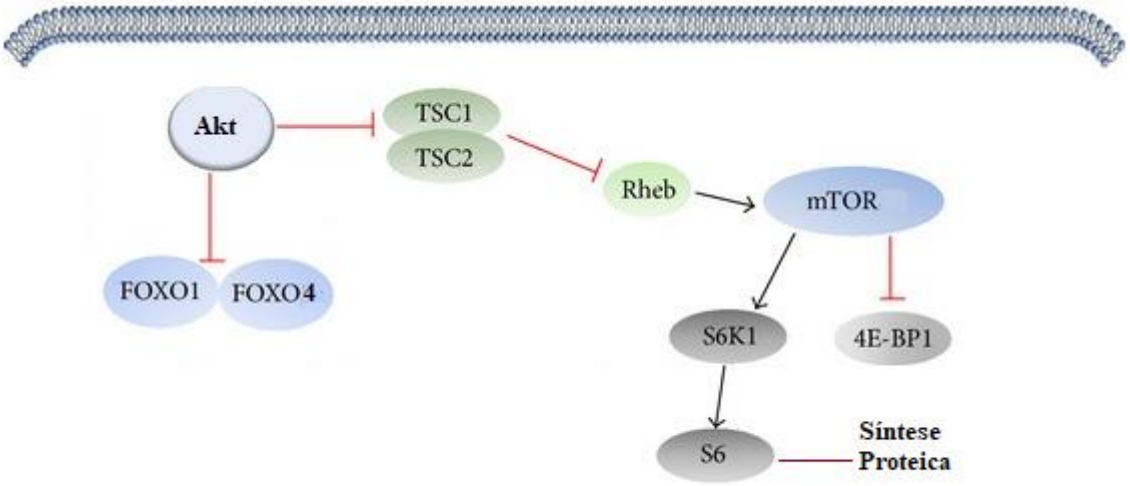


Figura 3 - Ativação da via de sinalização da PI3K/Akt, induz aumento da fosforilação dos Fatores de transcrição FoxO e mTor. (Adaptado de Wang, 2014 (Wang *et al.*, 2014))

1.7 JUSTIFICATIVA

Cisplatina induz estresse celular, inflamação, degeneração de nervos. Além de recrutar citocinas, mediadores inflamatórios, interleucinas. Baseado nos efeitos da Cisplatina, gostaríamos de obter respostas sobre o papel da PKR em um modelo utilizado para investigar a dor neuropática de origem quimiotóxica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os mecanismo de ação da PKR sobre o efeito deletério da Cisplatina nos sistemas: nociceptivo, muscular e mitocondrial

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o desenvolvimento de alodínia mecânica e hipernocicepção térmica em camundongos PKR-/- e PKR+/+ submetidos à administração do quimioterápico Cisplatina.

- Investigar o efeito da inibição farmacológica de PKR sobre a atividade de vias intracelulares de sinalização no gânglio da raiz dorsal após tratamento com Cisplatina. Foram investigados os mediadores MAPKs (Erk1,2, p38 e JNK/SAP).

- Investigar o efeito da inibição farmacológica de PKR sobre a atividade do fator de transcrição STAT-3 no gânglio da raiz dorsal após o tratamento com quimioterápico.

- Analisar o impacto na força e resistência muscular em camundongos PKR-/- e PKR+/+ submetidos à administração do quimioterápico Cisplatina.

- Avaliar o efeito da Cisplatina na proteólise total e síntese proteica em músculos esqueléticos (*Soleus* e EDL) em animais PKR -/- e PKR +/+, estudar o efeito *in vitro* da Cisplatina em células C2C12 e avaliar a fosforilação das proteínas da família Akt.

- Investigar o estresse oxidativo mitocondrial em células do gânglio da raiz dorsal de camundongos PKR-/- e PKR+/+ após tratamento com Cisplatina.

3 MATERIAL E MÉTODOS.

Os protocolos experimentais descritos foram realizados de acordo com as normas de conduta ética com animais de experimentação propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos experimentais descritos neste processo foram submetidos pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo nº 188 / 2016).

3.1 ANIMAIS

Foram usados camundongos machos, pesando 20-25 g, das linhagens C57Bl/C6 (na investigação da fosforilação proteica), PKR-/- (não possuem a proteína PKR em nenhum dos alelos) e PKR+/+ (possuem a proteína PKR em ambos dos alelos) (foram usados na avaliação comportamental e analise da proteólise total e síntese proteica e respiração mitocondrial). Camundongos PKR-/- e PKR+/+, foram fornecidos pelo Prof. Aristóbolo Mendes da Silva do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Essa linhagem foi aprovada pelo CTNBIO, Nº 0030/97 (Fig. 4). Em cada gaiola foram mantidos 5 animais em ambiente com temperatura (22 ± ºC) e umidade controlados, com ciclo claro:escuro de 12:12 hs (período claro a partir das 6:00 h) e com livre acesso a ração e água. O experimento foi conduzido de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor (Zimmermann, 1983)

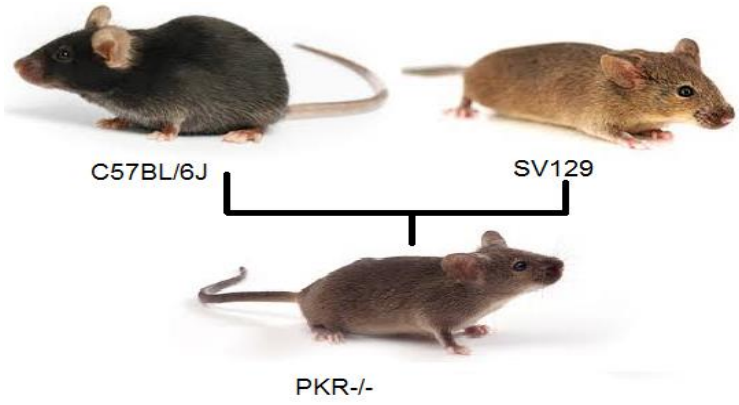
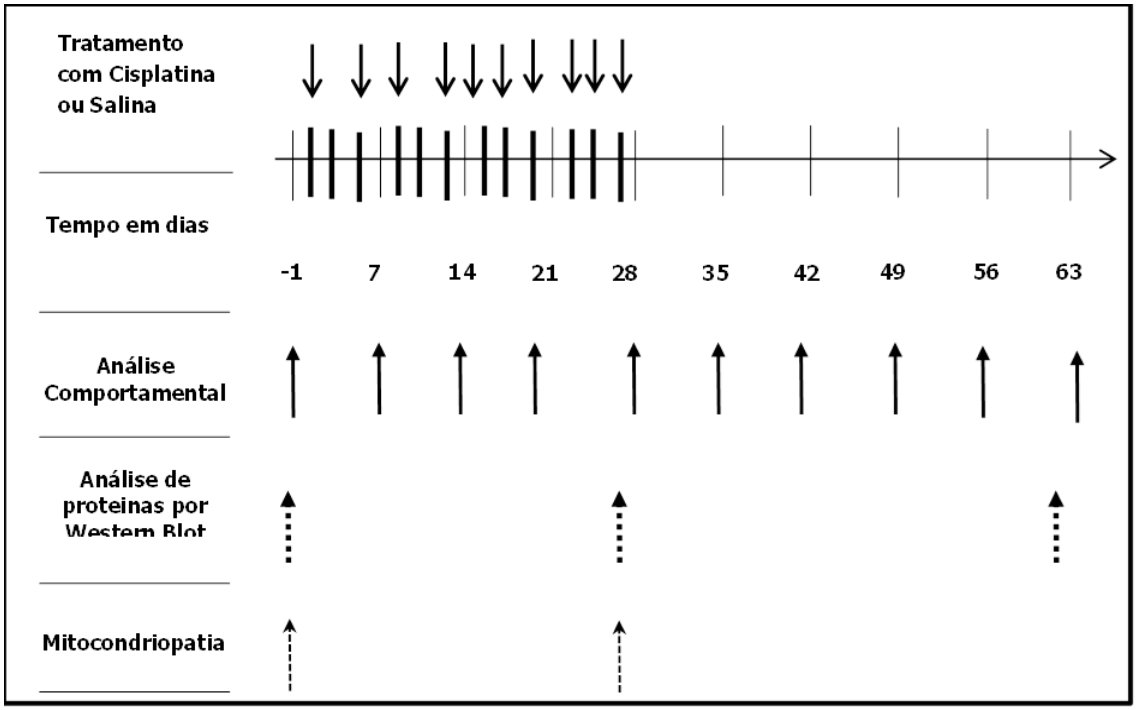


Figura 4 -Cruzamento C57Bl/6JxSV129

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO.

O modelo experimental de quimiotoxicidade consistiu da administração de Cisplatina (3,0mg/Kg em 1ml/Kg, intraperitoneal) 3 vezes por semana em dias alternados (segundas, quartas e sextas) durante 4 semanas, totalizando 36 mg/Kg da Cisplatina no final da última administração (quadro 1). Em conjunto com a administração de cisplatina, foi aplicado 1 mL de salina via subcutânea a fim de se minimizar os danos renais.



Quadro 1 Distribuição temporal dos experimentos

3.3 INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DO PKRI

Com o objetivo de investigar a repercussão da administração do PKRi- C16 (inibidor da proteína PKR) na fosforilação proteica (JAMMI et al., 2003) administramos via i.p. do inibidor ou do seu controle negativo. O PKRi (PKRi) (Calbiochem WWR International, San Diego, EUA) é um derivado oxindole/imidazole

que se liga ao sítio de ligação de ATP de PKR, o que inibe a sua autofosforilação induzida por RNA (JAMMI et al., 2003).

Nesse estudo, animais C57bl/6 receberam injeção i.p. de PKRi na dose de 0.2 mg/kg em 200 µL de 0.5% DMSO, a fim de investigar o efeito do PKRi na fosforilação de algumas proteínas estudadas. Os animais controle receberam injeção de 200 µL de controle negativo.

3.4 COMPORTAMENTO

Os estudos comportamentais foram realizados entre 8 e 12 horas e os animais submetidos a um único teste.

3.4.1 Teste de sensibilidade mecânica para monitoramento de alodínia

Antes do início do teste os animais foram levados ao local do teste e posicionados no aparato próprio para a aplicação e ficam no mínimo 1h para ambientação, evitando assim níveis de estresse. Para aplicação deste teste foi utilizada a metodologia que inicia com um filamento de força intermédia. Sempre que uma resposta positiva a um estímulo ocorreu, o próximo filamento mais fraco do Von Frey é aplicado, e sempre que ocorre uma resposta negativa é aplicado o próximo filamento mais forte (Figura 5). O teste continua durante cinco estímulos adicionais, após ocorrer a primeira mudança na resposta (Li et al., 2000). O padrão de respostas é convertido a um limiar de 50% de Von Frey usando a técnica descrita por Dixon (Dixon, 1980). Os filamentos utilizados variaram de uma força de 0.068g a 3.63g (Stoelting, Wood Dale, USA).

Figura 5- Representação do teste Von Frey

A resposta flexora ao estímulo mecânico foi monitorada antes da eutanásia e somente os animais com alodínia mecânica participaram dos experimentos. Cada grupo experimental teve 10-12 animais e a comparação entre diferentes grupos foram feitas pelo teste não paramétrico de Friedman. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3.4.2 Teste para monitoramento de hipernocicepção

O teste plantar Hargreaves (Hargreaves et al., 1988) mede a resposta ao estímulo de calor de infravermelhos, aplicada à superfície plantar . Antes do início do teste os animais foram levados ao local do teste e posicionados no aparato próprio para a aplicação (Fig.6) e ficaram no mínimo 1h para ambientação, evitando assim estresse de troca de ambiente. Um estímulo térmico radiante foi posicionado por baixo da pata traseira e a latência da resposta de retirada da pata foi medida automaticamente. Os animais foram colocados individualmente em compartimentos de 15 cm^2, sobre superfície de vidro transparente permitindo a passagem do feixe de luz capaz de provocar estímulo nociceptivo térmico. A estimulação foi automaticamente rescindida em 20s em animais refratários para evitar lesão tecidual. Foi determinada a latência de retirada da pata de cada pata traseira. Os dados foram apresentados como média ± EPM com n = 10-12. A análise estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Friedman, as diferenças foram consideradas significativas com um intervalo de confiança de $p < 0.05$.

Figura 6 - Aparato do teste Hargreaves

3.4.3 Teste para atividade motora e força muscular

O Rota Rod (EFF 412 – insight equipamentos, Ribeirão Preto, BR) é composta de uma plataforma de base e uma barra de ferro horizontal de 3 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, que tem uma superfície não escorregadia (Fig.7). Os animais foram testados para a sua capacidade de se manter na haste a uma velocidade de 19 rpm durante 10 min e 21 rpm por 50 min em 5 sessões (basal, 15d, 30d, 45d, 60d).

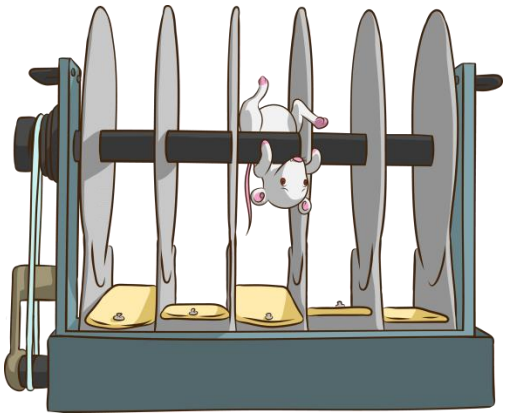


Figura 7 - Desenho ilustrativo do aparato utilizado para realizar o teste RotaRod.

Os animais foram pré-selecionados através de 2 dias de aprendizagem antes do ensaio, avaliando sua capacidade de permanecer na haste durante o tempo previsto.

Se o camundongo caísse fora da haste, seria colocado sobre a haste novamente. Durante a sessão, cada camundongo que caiu pelo menos quatro vezes em 1 min foi considerado em fadiga e retirado do teste. As estimativas de tempo do teste foram montadas em segundos.

A Cisplatina foi administrada durante as primeiras 4 semanas. É também possível avaliar o equilíbrio, a força de preensão e a coordenação motora do animal, principalmente após a lesão traumática do cérebro ou para testar o efeito de fármacos experimentais (Perez *et al.*, 1998).

3.4.4 Teste para medir a força muscular

Para avaliar a força muscular dos camundongos utilizamos em paralelo o grupo de animais do RotaRod.

O instrumento escolhido foi Grip-Strength Meter que mede automaticamente a força de aderência (ou seja, a força do pico e a resistência do tempo) dos membros anteriores e/ou membros posteriores em roedores.

O teste Grip Strength é um complemento para teste Rota-Rod para a coordenação motora e as experiências de função motora.

O animal é colocado sobre uma placa de base, na frente de uma barra de agarrar (em forma de T ou trapézio, ou uma grade), cuja altura é ajustável. A ferramenta de agarrar é montada em um sensor de força conectado ao amplificador de pico, o que garante uma detecção confiável e automática da resposta do animal. O transdutor de força tem uma força máxima aplicável de 1500g, com uma resolução de 0.1g (Basile, 2017).

3.5 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS E DE SEUS RESÍDUOS FOSFORILADOS.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os gânglios da raiz dorsal foram colhidos 48 horas após a última aplicação de Cisplatina, 30 min antes da coleta foi aplicado inibidor de PKR via i.p. (Injeção intraperitoneal) em metade do grupo cisplatina, o outra metade recebeu o controle negativo. As amostras retiradas de camundongos sem nenhum tratamento foram consideradas grupo Naive, os camundongos que tiveram tratamento com salina foram considerados o grupo Sham e por último o grupo tratado com a cisplatina.

Assim, os gânglios da raiz dorsal (L3-L6) de ambos os lados da medula espinal foram dissecados e homogeneizado em tampão de lise contendo NaCl 137 mM, Tris 20 mM, 1% Igepal CA-630 (Sigma Aldrich), 10% de glicerol, 2% de ortoxantadato de sódio, 0,1% de sulfato de dodecil de sódio, fluoreto de sódio 50 mM, EDTA 2 mM e coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich-P2714) a pH 7,4. Os homogeneizados de tecidos foram centrifugados a 40 000 g durante 10 minutos a 4 ° C e o sobrenadante foi recolhido para análise.

A concentração de proteína nos tecidos homogeneizados foi determinada por um ensaio de Lowry modificado (DC Protein Assay, Bio-Rad) e espectrofotometria (m-Quant; BioTek Instruments Inc, Winooski, VT). Alíquotas contendo 30µg de proteína foram dissolvidos em tampão de carga e lavadas no banho seco a 70ºC durante 10 minutos. As proteínas foram separadas por 10% ou 12% de Tris-glicina SDS-PAGE (GE Healthcare-Bioscience Corp., Piscataway, NJ) e transferidas para membranas PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Reações inespecíficas foram bloqueadas com leite a 5% (Nonfat Dry Milk Cell Signaling) durante 1 hora seguido de incubação com os seguintes anticorpos primários:

- p-Ser(256)-Foxo1 (1:750; anticorpo de coelho – Cell Signaling, EUA);
- p-Ser(193)-Foxo4 (1:750; anticorpo de coelho – Cell Signaling, EUA);
- p-Ser(473)-Akt (1:500; anticorpo de coelho – Cell Signaling);
- p- Thr(389)-S6K1 (1:500; anticorpo de coelho – Cell Signaling);
- p-Ser(235/236) (1:500; anticorpo de coelho – Cell Signaling);
- p-p44/42 MAPK ERK (1:1000; anticorpo de coelho – Cell Signaling);
- p- MAPK p38 (1:1000; anticorpo de coelho – Cell Signaling);
- p-Thr/Tyr(183/185)-JNK (1:1000; anticorpo de coelho – Cell Signaling);
- p-Ser (727)-STAT3 (1:1000; anticorpo de coelho – Cell Signaling);
- β-actina (1:20000; anticorpo de camundongo– Sigma-aldrich).

Durante a noite a 4ºC. Após a incubação, a membrana foi lavada e incubada com anticorpo secundário (1: 2000; ECL anti-rabbit IgG, GE Healthcare Ltd, Buckinghamshire, Reino Unido ou 1: 2000; ECL anti-mouse Sigma Saint Louis, EUA) durante 1 hora à temperatura ambiente. Proteínas marcadas foram detectadas por quimioluminescência.

Para a stripping e reprobing foi utilizado o tampão de remoção (ChemCruz sc-281698) foi aplicado nas membranas durante 35 minutos à temperatura ambiente, lavou-se durante 15 minutos com TBS-T antes de bloquear. Posteriormente, as membranas foram colocadas com anticorpo primário contra β-Actin (anticorpo anti-mouse de Actina 1: 40000, Sigma Saint Louis, EUA) para controle de carga. As transferências de Western foram quantificadas com o sistema de análise de imagem (Molecular Imaging Systems, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA). Após a normalização com β-Actin, os dados foram apresentados como porcentagens

médias da proteína aos seus respectivos níveis de intensidade de sinal encontrados em animais de controle que foram designados como 100%.

3.6 MEDIÇÕES DE PROTEÓLISE E ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS GLOBAIS IN VITRO

Para experiências *in vitro*, os músculos *soleus* de camundongos PKR-/- e PKR+/+, tratados com cisplatina ou salina foram isolados, pesados, mantidos em aproximadamente seu comprimento de repouso fixando-os em suportes plásticos inertes e incubados a 37 ° C em tampão de bicarbonato de Krebs-Ringer (pH 7.4, glicose 5 mM, equilibrado com 95% de O2 e 5% de CO2).

3.7 MEDIÇÕES DE PROTEÓLISE E ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS GLOB*AIS IN VITRO*

Resumidamente, após 2 h de incubação no tampão de bicarbonato de Krebs-Ringer, a proteólise total foi determinada medindo a taxa de liberação de tirosina no meio de incubação na presença de cicloximximida (0,5 mM). A libertação de tirosina foi ensaiada usando o método fluorimétrico (Waalkes e Udenfriend, 1957).

3.8 CULTURA DE CÉLULAS C2C12

Os mioblastos C2C12, uma linhagem de células musculares esquelética de camundongo, foram cultivados conforme descrito pelo fornecedor American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Resumidamente, os mioblastos C2C12 foram cultivados em placas e foram mantidos em meio de crescimento (GM) contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA), 100 U / mL de penicilina (Sigma Aldrich) e 50 µg / ml de estreptomicina (Sigma Aldrich). Quando as células atingiram 80% de confluência, o meio foi substituído por meio de diferenciação (DM, DMEM suplementado com 2% de soro de cavalo (HS) 100 U / mL de penicilina e 50 µg / ml de estreptomicina). Após cinco dias de diferenciação as células foram incubadas na presença ou ausência de Cisplatina na concentração de 50µM.

3.9 MEDIDAS DO CONSUMO DE OXIGÊNIO

Os ensaios de consumo de oxigênio foram realizados a 37 ° C por ventilometria de alta resolução (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) (Fig.8), equipado com agitação magnética (200 rpm) e câmara termostatizada a 30ºC.

Figura 8 - Oxygraph-2k, Oroboros Instruments

O seu pacote de software DatLab adequada (Oroboros) foi usado para a aquisição de dados (em intervalos de tempo de 2s) e a análise, incluindo o cálculo da derivada do tempo da concentração de oxigênio, convolução de sinal (dependente do tempo de resposta do sensor de oxigênio) e a correção em instrumental fluxo de oxigênio de fundo (La Guardia *et al.*, 2013; Rossato *et al.*, 2014).

Foram retirados em média 10 gânglios da raiz dorsal de cada animal e o músculo *soleus* de cada pata, totalizando dois músculos por animal, logo em seguida foram incubados em 2,1 ml de tampão de respiração MiR05 (EGTA 0,5 mM, 3 mM de MgCl 2 .6H 2 O, L-ácido lactobiónico 60 mM, taurina a 20 mM, 10 mM de KH 2 PO 4, 20 mM de HEPES, 110 mM de D-sacarose, 1 g de BSA / L) a 37 ° C e a câmara foi fechada. Após a determinação das taxas respiratórias no estado de rotina (R), succinato 10 mM será adicionado para medir a respiração suportada pelo substrato ligado Complexo -II (estado CII), e 220 uM de ADP para determinar o estado Fosforilado (P). Em seguida, os seguintes moduladores da função

mitocondrial foram sequencialmente adicionados, oligomicina (1 ug / mL), um inibidor da ATP sintase para estabelecer a fosforilação ou estado do vazamento (L), e a hidrazona protonophore carbonil cianeto de m-clorofenilo (CCCP) (quatro adições de 1M cada) para determinar o estado da capacidade máxima do sistema de transporte de elétrons (estado ETS, E), ou, o estado desacoplado. (Fig.9).

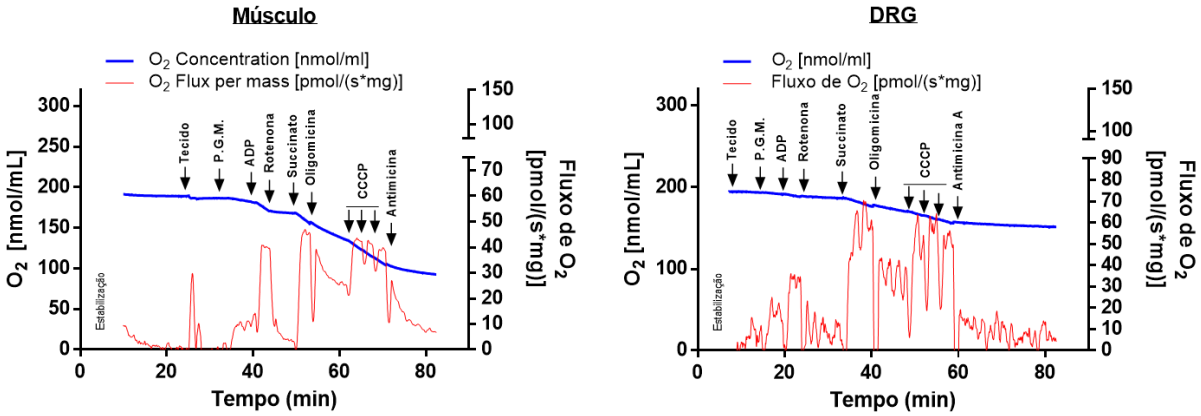


Figura 9 - Representação do gráfico de ensaio de Oxygraph mostrando o tempo em que as mitocôndrias do músculo *soleus* foram adicionadas à câmara de reação, seguido pela adição sequencial de succinato, ADP + Pi, oligomicina e três doses de CCCP. A linha azul refere-se à diminuição da concentração de oxigênio (eixo vertical direito) dentro da câmara e a linha vermelha ao fluxo de oxigênio (eixo vertical esquerdo), indicando o oxigênio consumido pela amostra de tecido. O eixo horizontal representa a escala de tempo de cada experimento de 80 minutos.

Após terminar a sessão de ensaio, o meio contendo o tecido foi recolhido com uma pipeta e transferido para tubos contendo 200 mL de 8M de KOH. Três alíquotas de 1 mL cada foram utilizados para quantificar o conteúdo de proteína total pelo método de Bradford. Os resultados de proteína foram então utilizados para normalizar as medições da função mitocondrial.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises dos testes comportamentais foram realizadas utilizando ANOVA de uma via para análises intragrupo e ANOVA de duas vias para comparações entre os grupos. Para ambos os ensaios foram aplicados pós-testes de Bonferroni para comparações múltiplas. As análises da imunodetecção de proteínas foram realizadas pelo teste t de Student não pareado para comparação entre o grupo

experimental e o controle. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0.05$ (GraphPad Prism 6 software).

3.11 ASPECTOS ÉTICOS SOBRE O USO DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os protocolos experimentais descritos neste processo seguem as normas de conduta ética com animais de experimentação propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O uso de animais neste trabalho é imprescindível por não existirem métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas ou sistemas biológicos *in vitro* que reproduzam a complexidade dos fenômenos biológicos e fisiopatológicos a serem investigados.

4 Resultados

4.1 A CISPLATINA PROVOCA ALTERAÇÕES NA SENSIBILIDADE DOLOROSA EM CAMUNDONGOS PKR+/+ e PKR-/-.

Os animais PKR+/+ tratados com cisplatina apresentaram redução do limiar na pata (teste Von Frey) a partir da primeira semana após o tratamento tanto em relação ao momento basal ($p<0.001$) quanto em comparação ao grupo tratado com o veículo (salina) ($p<0.001$) (Fig. 10A). Em animais PKR-/-, não houve alterações do limiar em nenhum dos momentos avaliados em comparação ao seu grupo controle, mas houve alteração a partir do 7º dia em comparação ao valor basal.

Em relação ao limiar de resposta ao estímulo térmico (Fig. 10B) da pata (teste Hargreaves) apresentou-se reduzida em animais PKR+/+ tratados com cisplatina do 7º ao 63º dia comparados com o seu grupo controle ($p<0.001$). Em animais PKR-/-, a cisplatina causou alteração da latência em comparação ao seu grupo controle ($p<0.01$), mas não em relação ao seu basal em nenhum dos momentos avaliados.

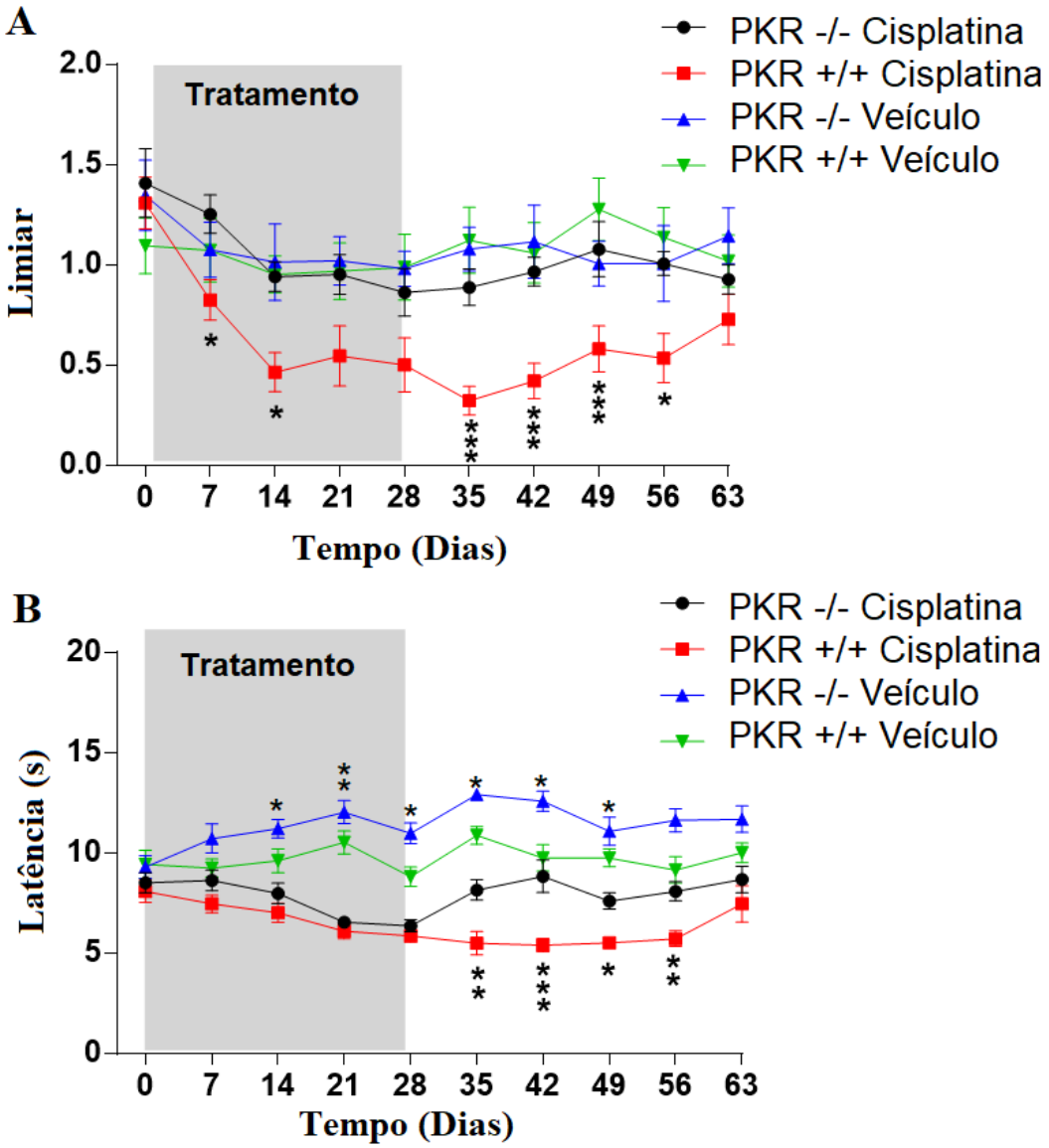


Figura 10 - Valores observados para a latência ao teste de Hargreaves (A) e limiar no teste de Von Frey (B) em animais PKR+/+ e PKR -/-, tratados com cisplatina e solução salina, no momento basal, durante a aplicação de quatro semanas e por cinco semanas após o fim do tratamento. Animais que receberam solução veículo (salina) apresentam valores de latência maiores, quando comparados àqueles que receberam o quimioterápico Cisplatina, por sua vez animais PKR -/- apresentam valores absolutos maiores, quando comparados aos seus controles, além disso esses animais apresentam maior tolerância ao teste mecânico quando comparados àqueles PKR +/+. A cisplatina tornou os animais mais sensíveis, mesmo à filamentos de Von Frey mais finos quando comparados aos animais que receberam apenas solução veículo (***p<0.0001, ** p<0.001, * p<0.01em relação ao grupo PKR -/- que recebeu cisplatina, utilizando ANOVA de duas vias seguido de pós-testes de Bonferroni, n=12-15/grupo).

4.2 EFEITOS DA CISPLATINA APLICADA DE FORMA SISTÊMICA NA FOSFORILAÇÃO DE p38, JNK E ERK1,2. E NO FATOR DE TRANSCRIÇÃO STAT3.

Foram coletados os gânglios da raiz dorsal em animais C57Black/C6 após 48 horas após a última aplicação de Cisplatina, 30 min antes da coleta foi aplicado inibidor de PKR (Calbiochem WWR) via i.p. (Injeção intraperitoneal) em metade do grupo cisplatina, o outra metade recebeu o controle negativo. Tratados com a cisplatina ou com seu veículo (salina), o mesmo ocorreu com o grupo Sham. Depois por Western Blot analisamos a fosforilação das proteínas p38, JNK, ERK1,2 e do fator de transcrição STAT3

Nesses resultados, demostramos que a cisplatina provoca redução da fosforilação de p38 após quatro semanas de tratamento ($p<0.05$) e que o PKRi inibe a redução da fosforilação (Fig. 11A).

A análise das proteínas MAPK: JNK e ERK1,2, mostrou que nos grupos estudados não ocorreu nenhuma diferença entre a fosforilação e controle (CTL-veículo) (Fig. 11B e 11C).

No fator de transcrição STAT3, ocorreu um aumento de sua fosforilação nos grupos Cisplatina e Cisplatina com PKRi($p<0.05$) (Fig. 11D).

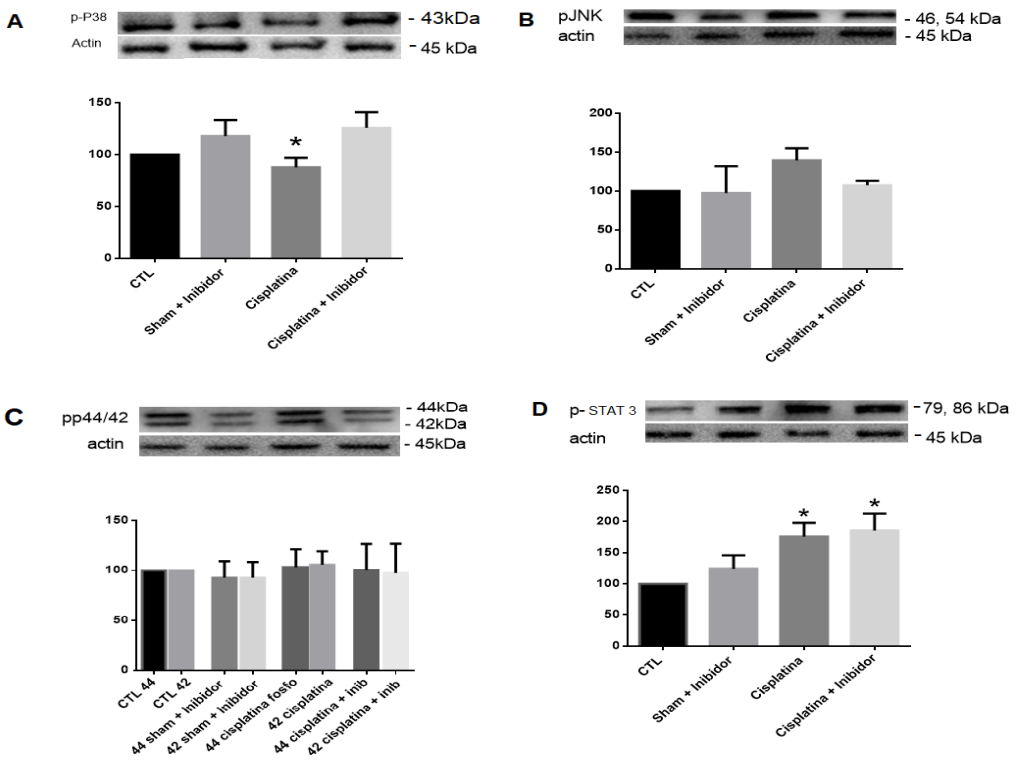


Figura 11- Perfis de fosforilação de (A) p38, (B) JNK e (C) ERK1,2 (D) STAT3 expressos como porcentagem da fração entre a proteína e a β-actina em DRG de animais C57bl/6 tratados com Cisplatina e salina, retirada do tecido após 30 min da administração i.p. de 0.2 mg/kg do PKRi ou seu veículo. Resultados expressos em média ± E.P.M. (*p<0.05 em relação ao grupo CTL, utilizando teste t de Student não pareado, n=5-8/grupo).

4.3 MEDIDA DO PESO CORPORAL E TESTES PARA MEDIR FORÇA E RESISTÊNCIA MUSCULAR

Baseado na observação empírica sobre ganho de peso corporal dos animais tratados com salina e com cisplatina resolvemos acompanhar esse peso em quatro grupos, sendo eles: animais PKR-/- tratados com salina ou cisplatina e animais PKR +/+ (WT) tratados com salina ou cisplatina.

Foi realizado a pesagem dos animais de cada grupo por 10º semanas. Os valores utilizados estão apresentados como a diferença do ganho de peso a cada semana (delta) (Fig.12). Observa-se que animais tratados com salina tem um aumento de peso durante cada semana, até o ultimo dia avaliado. Já PKR-/- tratados com cisplatina ficaram estagnados em seu peso inicial, a partir do final do tratamento esses animais começaram a ter um aumento de peso corporal. Os PKR

+/+ tratados com cisplatina tiveram uma perda de peso durante o tratamento, conseguindo recuperar e aumentar seu peso apenas a partir da 5ª semana.

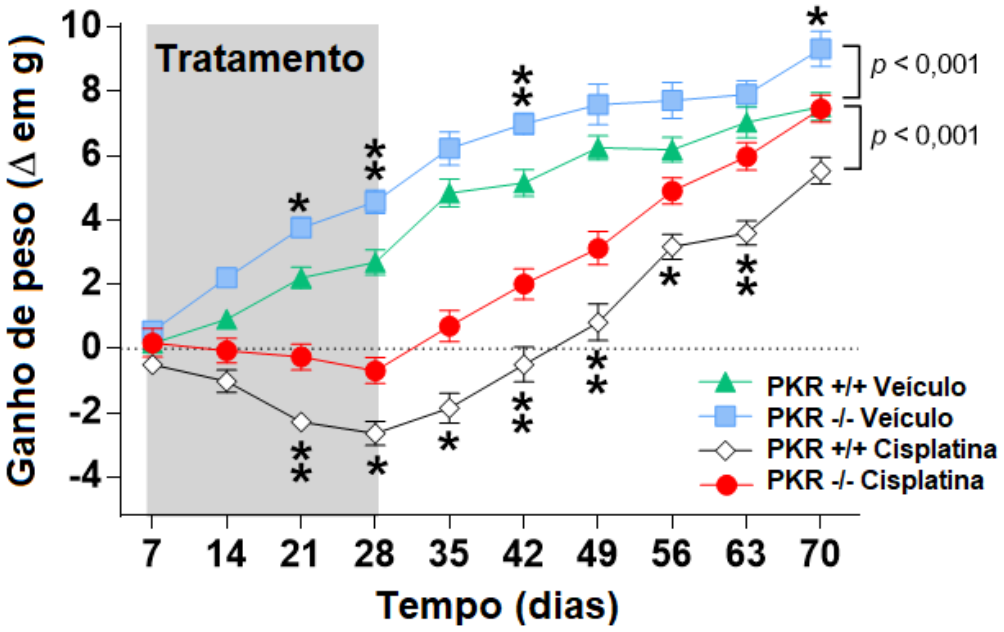


Figura 12 - Dados em Δ da modificação do peso corporal em animais PKR-/- e PKR +/+ tratados com o quimioterápico Cisplatina e com seu veículo (salina).

Ao mesmo tempo que era feito a medida do peso corporal, foram realizados testes para medir a força e a resistência muscular do quatro grupos citados.

No teste Rotarod com objetivo de analisar a resistência muscular desses animais (Fig. 13A), foi observado que camundongos PKR +/+ depois do início do tratamento com o quimioterápico, possuem uma resistência menor que camundongos PKR -/-. Esse dado também é demostrado quando analisamos a porcentagem de animais fadigados durante o exercício físico (Fig. 13B), animais PKR +/+ aumentam esses eventos no final do tratamento, já os PKR -/- não houve alteração na fadiga em nenhum dos momentos avaliados.

No teste para avaliar a força muscular desses animais, utilizou o Grip-Strength Meter (Fig. 13C), e semelhante ao teste de resistência muscular, animais PKR +/+ tratados com cisplatina, diminuíram a porcentagem de força comparado ao seu valor basal, essa mudança começa a partir do início do tratamento, alterando mais conforme o tratamento progride, chegando ao seu pico na 6ª semana, depois do final do tratamento (quatro semanas após) ocorre uma recuperação da força muscular. Já o grupo os PKR -/- também tratados com cisplatina não há alteração significativa da força muscular durante todo o tempo avaliado ($p<0.001$).

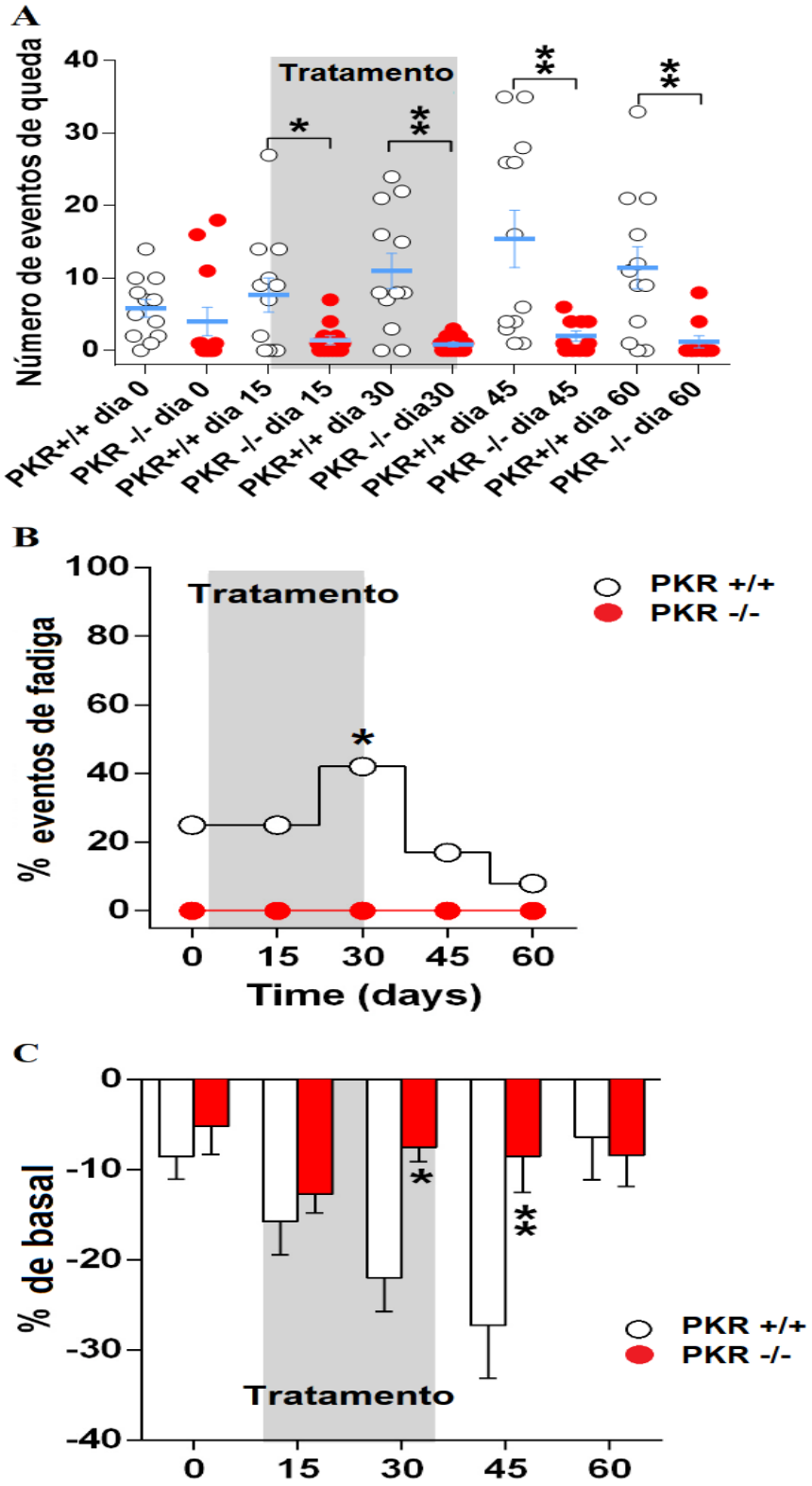


Figura 13- Valores observados para a resistência muscular no teste RotaRod (A) valores observados da fadiga muscular (B) e porcentagem da força muscular no teste o Grip-Strength Meter (C) em animais PKR+/+ e PKR -/-, tratados com cisplatina. Foi analisado o valor basal, o tempo durante a aplicação de quatro semanas e por quatro semanas após o fim do tratamento. Animais PKR +/+ apresentaram valores menores, quando comparados àqueles que receberam os PKR -/- (** $p<0.001$, * $p<0.01$, relação entre o grupo PKR +/+ e grupo PKR -/- que receberam cisplatina, utilizando ANOVA de duas vias seguido de pós-testes de Bonferroni, n=12-15/grupo).

4.4 ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS EM MÚSCULO *SOLEUS* E GÂNGLIOS DA RAIZ DORSAL DE ANIMAIS PKR-/- E PKR +/+ TRATADOS COM CISPLATINA.

Foi realizado o monitoramento do consumo de O2 (Fig.9) para verificar se o aumento do consumo de O2 corporal está relacionado a um aumento do metabolismo mitocondrial no gânglio da raiz dorsal e músculo *soleus* de animais dos quatro grupos que são: PKR +/+ e PKR -/- tratados com cisplatina; PKR -/- e PKR +/+ tratados com salina.

As mitocôndrias isoladas foram incubadas em meio de respiração e energizadas com 5 µg/mL de glutamato/malato ou 5 µg/mL de succinato (substratos de complexo I ou II, respectivamente). Após isto, foi adicionado ADP para determinação do estado de fosforilação (estado III) e, a do estado de repouso (estado IV).

Na respiração mitocondrial do músculo *soleus* (Fig.14A) encontrou-se diferenças significativas nos animais PKR-/- quando comparados aos animais PKR+/+, tratados ou não com cisplatina.

O animal PKR-/- teve maior velocidade de respiração no Complexo I, mais eficiência de fosforilação (ADP) entre os grupos. Quando as mitocôndrias foram energizadas com succinato (complexo II), a atividade dessas proteínas foi aumentada, demostrando sua dependência do substrato respiratório, e ocorre também na presença da oligalicina (inibe a respiração relacionada à fosforilação oxidativa) e da CCCP (estimula a atividade máxima do sistema de transporte de elétrons e induz as maiores taxas de consumo de oxigênio), mas não ocorre no presença de Rotanona e de AA (inibe a atividade do complexo III, sendo utilizado para determinar o consumo de oxigênio não relacionado à atividade da cadeia respiratória (Baraldi *et al.*, 2016).

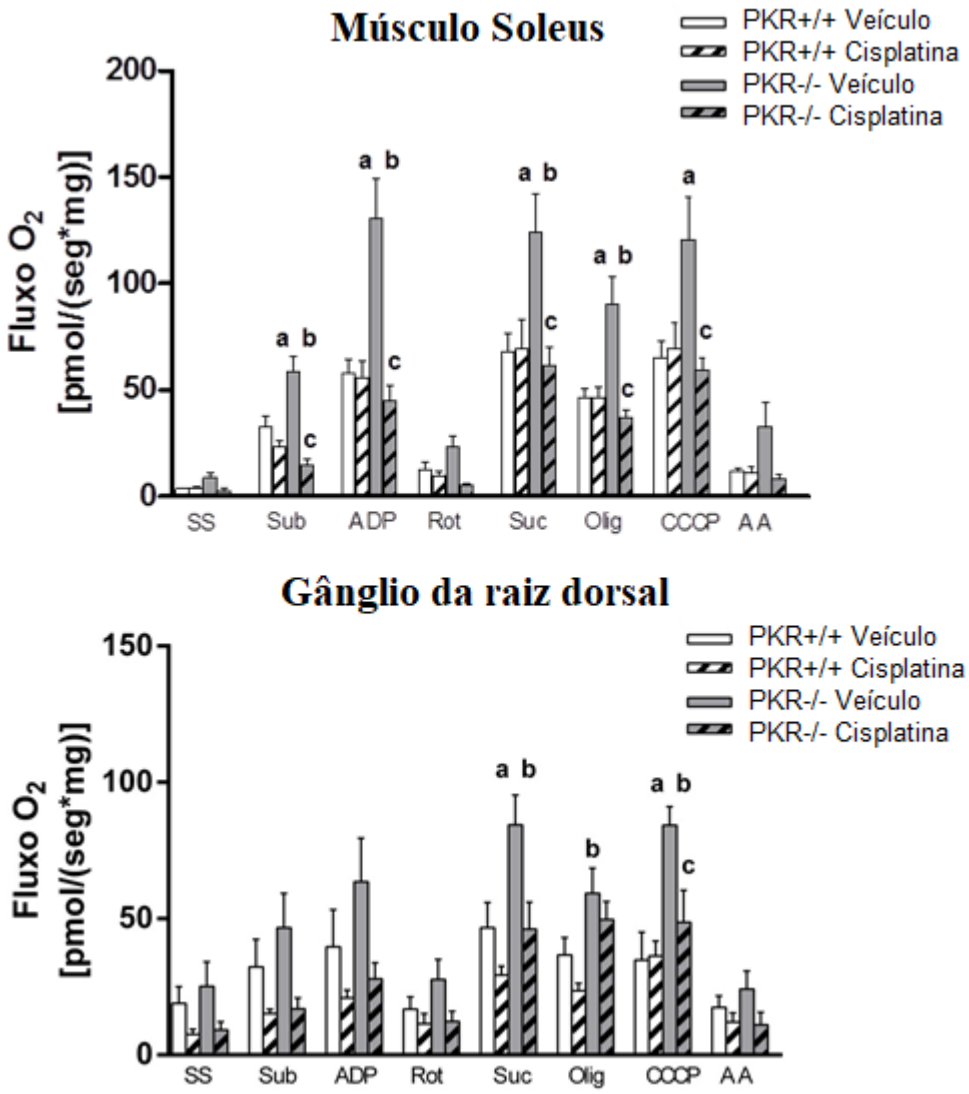


Figura 14- (A)Taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas do músculo *soleus* de camundongos PKR +/+ tratados com cisplatina; PKR +/+ tratados com salina; PKR -/- tratados com cisplatina; PKR -/- tratados com salina. Diferença estatística com P < 0,05. A P < 0,05 vs controle. N = 5-8. a= diferença entre PKR-/- e PKR +/+ controle, b= diferença entre PKR -/- controle e PKR +/+ cisplatina c= diferença PKR -/- controle e cisplatina . (B) Taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas do gânglio da raiz dorsal de camundongos PKR +/+ tratados com cisplatina; PKR +/+ tratados com salina; PKR -/- tratados com cisplatina; PKR -/- tratados com salina. Diferença estatística com P < 0,05. A P < 0,05 vs controle. N = 5-8 a= diferença entre PKR-/- e PKR +/+ controle, b= diferença entre PKR -/- controle e PKR +/+ cisplatina c= diferença PKR -/- controle e cisplatina.

Se a mitocôndria não tiver um bom acoplamento de fosforilação oxidativa, espera-se um aumento na velocidade de consumo de O2 no estado IV e diminuição dos valores de CR-controle respiratório (estado III / estado IV) e ADP. A razão ADP/O é utilizada para avaliar a eficiência de fosforilação das mitocôndrias, uma vez que ela representa o número de moléculas de ATP sintetizadas por cada átomo de

oxigênio consumido. O CR juntamente com ADP são utilizados como parâmetros para demonstrar a funcionalidade da preparação mitocondrial (Hinkle, 2005; Ferreira *et al.*, 2008; Nelson e Cox, 2014).

Com relação a respiração mitocondrial do gânglio da raiz dorsal (Fig.14B), analisamos que, quando foi acrescentado o estado de fosforilação (estado III) em mitocôndrias energizadas com glutamato/malato, encontramos velocidades sem diferença estatística, porém quando foram energizadas com succinato, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na velocidade da respiração no grupo PKR-/-, este prevalecendo sobre os grupos de PKR +/+. Quando adiciona-se a oligalicina, inibindo-se assim a ATP sintase, essa diferença continua, entre o grupo PKR-/- salina em relação ao PKR+/+ cisplatina. Quando acrescenta-se o desacoplador químico CCCP (que promove o retorno de H+ para a matriz através da membrana mitocondrial interna, reduzindo o potencial de eletroquímico de H+, consequentemente estimulando a máxima velocidade de transferência de elétrons e consumo de O2), ocorre uma diferença do grupo PKR -/- salina, em relação a todos os outros três grupos. Juntos esses resultados demostram que o animal controle sem a proteína PKR possui um fluxo de O2 mais elevado que os outros grupos.

4.5 TRATAMENTO EM C2C12, SÍNTESE PROTEICA E PROTEÓLISE MUSCULAR EM CAMUNDONGOS PKR-/- E PKR +/+ TRATADOS COM CISPLATINA E PKR-/- E PKR +/+ TRATADOS COM SALINA

A partir do acompanhamento do peso corporal (Fig. 12) dos animais PKR-/- e PKR+/+ tratados com Cisplatina ou com seu veículo, fomos avaliar qual seria o motivo para a diferença encontrada.

Inicialmente foi pesado o músculo tibial anterior (fibras mistas) de cada animal dos quatros grupos estudados (Fig. 15A), depois do final do tratamento com o quimioterápico ou com seu veículo (4ª semanas de tratamento), definido-se a massa corporal muscular. Foi verificado que a Cisplatina reduz a massa corporal dos animais PKR+/+ em comparação com os PKR +/+ tratados com salina ($p<0.01$). Já em animais PKR-/-, a cisplatina não demostrou nenhuma redução da massa corporal quando comparado com seu grupo controle, os PKR -/- tratados com salina.

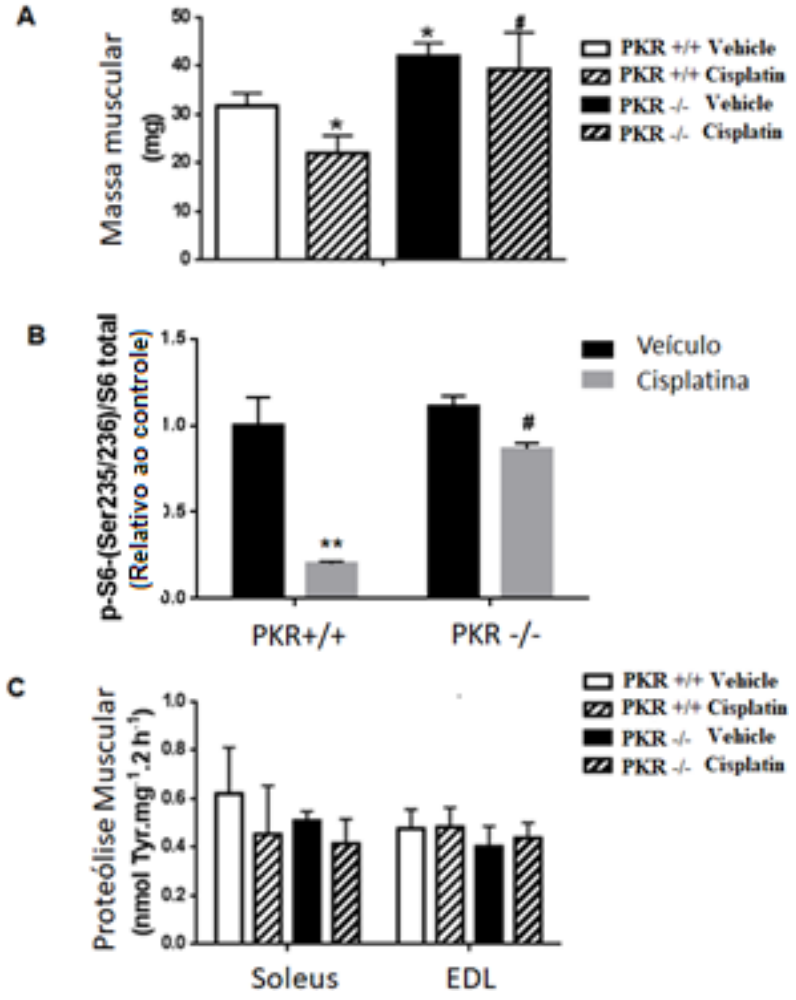


Figura 15 - Valores avaliados da massa corporal a partir do músculo tibial anterior de animais PKR-/- tratados com salina e cisplatina e PKR+/+ tratados com salina e cisplatina (A) Valores observados do marcador para síntese proteica, a proteína S6 (B) e Valores referente a proteólise muscular (C) em animais PKR+/+ e PKR -/-, tratados com cisplatina. Foi analisado músculos de animais dos quatros grupos citados, após 48h do final do tratamento com cisplatina ou salina. Animais PKR +/+ apresentaram valores menores, quando comparados àqueles dos PKR -/- (* $p<0.01$, relação entre o grupo PKR +/+ salina e todos os outros grupo que receberam cisplatina e salina, # $p<0.01$ relação do grupo PKR -/- com o grupo PKR -/-, utilizando ANOVA de duas vias seguido de pós-testes de Bonferroni, n=6-8/grupo).

Baseado nas diferenças entre os quatro grupos, o próximo passo foi analisar se havia algum efeito deletério da Cisplatina associado com a PKR na síntese proteica e na proteólise. Para analisar a síntese (Fig. 15B) utilizamos uma proteína que serve de marcador para essa ação, pois ela tem influência positiva no complexo de tradução e aumento da célula muscular, a S6(Ser235 / 236), o músculo utilizado foi o gastrocnémio. Podemos avaliar que em animais PKR +/+ a síntese proteica foi reduzida após o tratamento com ($p<0.001$), já nos animais PKR-/- não houve nenhuma alteração.

Em relação proteólise muscular (Fig.15C), analisou-se dois tipos musculares, o EDL, por ser um musculo glicolítico e de contrações rápidas e o *Soleus*, por ser um antagonista do EDL, sendo um musculo oxidativo e de contrações lentas. Nesse experimento não houve alteração significativamente entre nenhum dos grupos.

A partir dos dados encontrados referente à síntese proteica, nos aprofundamos no assunto e foi feito a detecção de proteínas que participam dessa via (Fig. 16A), a partir da proteína Akt (Ser 473) em células mioblastos C2C12, o quimioterápico cisplatina foi analisado temporalmente (6h, 12h e 24h). Analisou-se as proteínas p-FoxO1(Ser276), p-FoxO4 (Ser 193), Akt (Ser 473), p-S6k1 (Thr380) e a p-S6 (Ser 235/236).

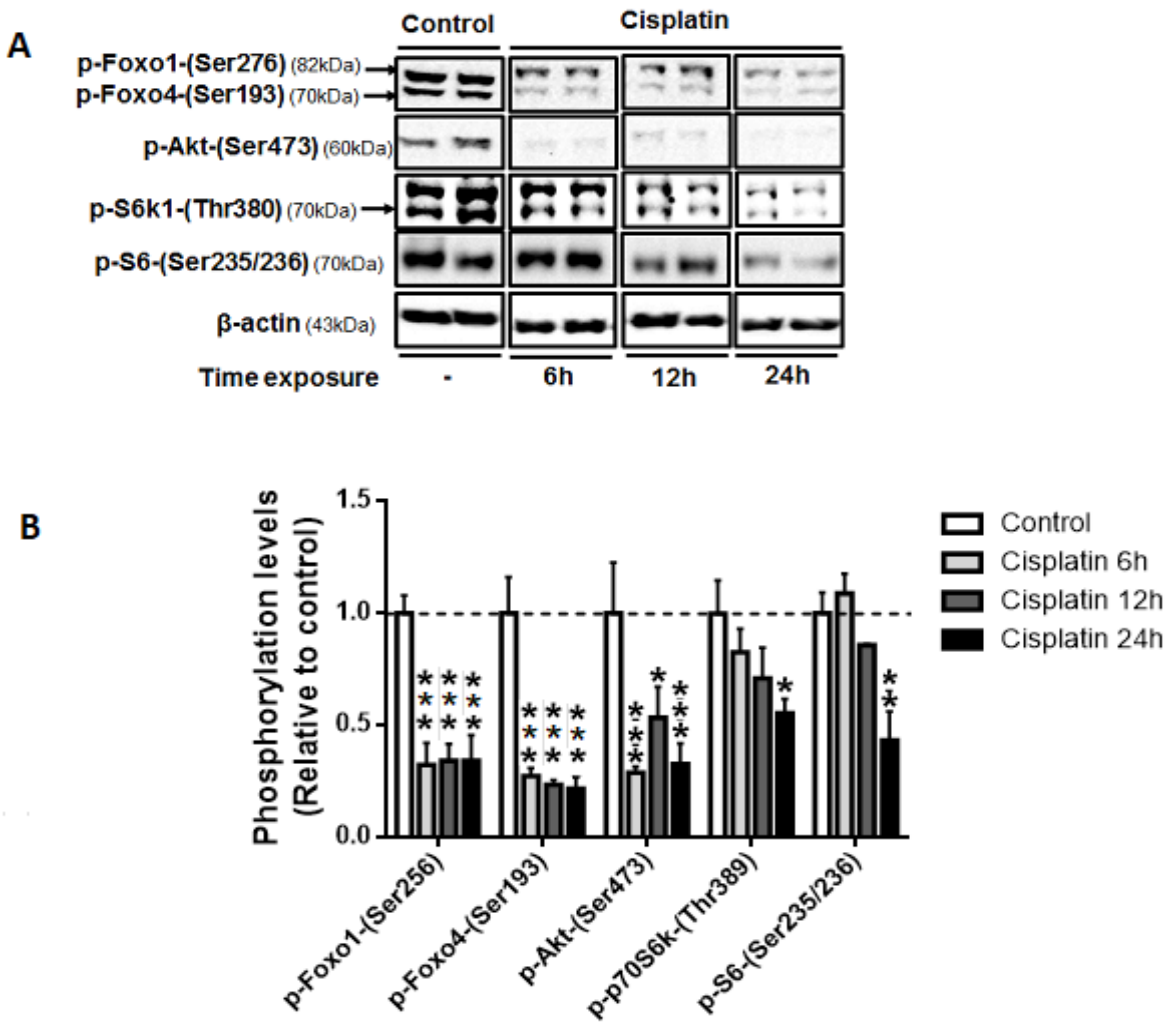


Figura 16: Efeitos *in vitro* em células mioblastos C2C12, avaliando temporalmente o efeito da Cisplatina em níveis de fosforilação de vários substratos da Akt-(Ser473), a técnica Western Blot (A) e posteriormente sua quantificação e analise (B). Os valores são expressos como média±EPM de 4-8 músculos por grupo em relação aos valores controle considerados como 100%, (*) $p<0,05$ vs.

Depois de quantificar essas proteínas (Fig.16B), chegamos aos resultados que demostram a diminuição do nível de atividade de fosforilação dessas proteínas a partir de 6h do efeito da cisplatina, sendo muito evidente nas proteínas p-FoxO1 e p- FoxO4 ($p<0.0001$).

5 Discussão

No presente estudo, analisamos a importância da ação da proteína quinase dependente de RNA (PKR) como molécula sinalizadora em um modelo de origem quimiotóxico, utilizando o quimioterápico Cisplatina como o medicamento em estudo. Utilizamos abordagens comportamentais, genéticas, farmacológicas e moleculares para demostrar que nesse modelo a PKR modula diversas vias de sinalização intracelulares e alterações na respiração mitocondrial em GRD (gânglio da raiz dorsal) e no músculo *Soleus*. Estudamos os componentes nociceptivo e muscular, e constatamos nesses experimentos o efeito deletério da PKR em um tratamento quimioterápico com a Cisplatina.

A utilização de medicamentos quimioterápicos pode, em muitos casos, comprometer o bem estar do indivíduo mesmo após o término do tratamento. Os derivados da platina estão entre os principais fármacos empregados na clínica para tratamentos oncológicos e estão envolvidos com o desenvolvimento de determinadas alterações fisiológicas. Em sua revisão sobre as principais classes quimioterápicas Carozzi e Chiorazzi (Carozzi *et al.*, 2015) discutem a importância dos análogos de platina na clínica oncológica, bem como algumas das alterações celulares induzidas por antineplásicos. Os neurônios do gânglio da raiz dorsal são considerados os principais alvos das drogas Pt (Platina), por serem altamente vascularizado, onde causam apoptose em neurônios sensoriais. A grande relevância da utilização de cisplatina, segundo os autores, reside no fato de sua atuação estar diretamente ligada ao componente genético, com a formação dos adutos de Pt-DNA nuclear e mitocondrial, como discutido anteriormente, impedindo que a célula prossiga seu processo mitótico desgovernado.

Entretanto, entre os efeitos colaterais da utilização de cisplatina está o desenvolvimento de neuropatias periféricas. Neijt e colaboradores (Neijt *et al.*, 2000) demostraram a relação de mecanismos moleculares com neuropatias induzidas por quimioterápicos. Os dados existentes na literatura ainda são insatisfatórios, necessitando de melhores investigações para o delineamento das vias de sinalização intracelular, moléculas e receptores envolvidos, bem como uma melhor caracterização da severidade e evolução dessa patologia. O conhecimento obtido, poderia então, ser empregado em triagens clínicas melhorando qualidade de vida

dos pacientes com neuropatias periféricas, além de oferecer importantes dados para pesquisas futuras (Li *et al.*, 2014). Por sua vez, diversos estudos têm buscado identificar diferentes compostos que administrados juntamente com cisplatina poderiam reduzir os sintomas negativos do tratamento quimioterápico (Cavaletti *et al.*, 1995). Embora o risco de nefrotoxicidade tenha sido parcialmente melhorada por pré-hidratação intensa antes da administração de Pt-drogas, as intervenções para reduzir ou evitar a neurotoxicidade mostraram-se ser infrutíferas (Carozzi *et al.*, 2015).

As MAPKs são ativadas sob diferentes condições de dor persistente que levam à indução de hipersensibilidade à dor através da regulação transcripcional. Alguns estudos mostraram que os inibidores de MAPK inibem hiperalgesia e alodinia em modelos de dor inflamatória e neuropática, mas esses inibidores têm pouco ou nenhum efeito na percepção basal da dor fisiológica, sugerindo um papel específico de MAPKs no desenvolvimento de hipersensibilidade à dor após lesão do tecido e do nervo (Ji e Suter, 2007; Khan *et al.*, 2013).

O fator de transcrição STAT3 é ativado após a lesão dos nervos central e periférico, a lesão traumática da medula espinhal leva a uma fosforilação rápida de STAT3 no parênquima da medula espinal (Yamauchi *et al.*, 2006) e a transecção do nervo ciático resulta em uma ativação da via JAK / STAT3 localmente no nervo. De fato, a forma fosforilada de STAT3 está presente no soma do nervo sensorial nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e nos neurônios motores na medula espinal ventral (Maclennan *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2005). Nos nervos periféricos, a via de sinalização JAK / STAT3 participa da resposta local à lesão nervosa e à regeneração axonal (Schwaiger *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2005).

Em seu trabalho, Urban e Gebhart (Urban e Gebhart, 1999) evidenciam que danos aos nervos periféricos, ou mesmo em estruturas nervosas centrais, podem ocasionar dores neuropáticas que ativam vias ascendentes da dor na medula espinal, sendo a resposta desenvolvida por estruturas centrais de modulação da dor no córtex sensitivo dependente da extensão e do tipo de lesão ao componente sensorial. Já Bianco e colaboradores (Bianco *et al.*, 2012) mostram que as dores crônicas estão relacionadas a degenerações de componentes periféricos, dessa forma esta pode ser referida em muitos pacientes mesmo após o término do estimulo que a ocasionou. Em nosso estudo, demostramos que os camundongos

tratados com a cisplatina, tanto os PKR-/- quanto os PKR +/+ apresentaram diferentes resultados comportamentais no teste de latência térmica e no teste de limiar mecânico, mesmo após o término da administração do fármaco.

Inúmeros laboratórios utilizam modelos animais para avaliar parâmetros envolvidos com a instalação e desenvolvimento de processos dolorosos. Modelos animais ainda são de grande importância no estudo da dor, pois a maioria destes podem apresentar, quando sensibilizados, tanto o comprometimento sensorial quanto o motor, fornecendo dados bastante parecidos com o que ocorre em humanos. Entretanto, a análise comportamental ainda merece especial atenção (Mogil, 2009). Muitas vezes ações mecânicas inerentes ao comportamento do animal em análise podem ser confundidas com reações de dor, o que pode gerar falsos dados ao resultado final do estudo (Vadakkan *et al.*, 2005).

Sabe-se, por resultados de trabalhos anteriores, que a neuropatia periférica em camundongos assemelha-se à de humanos (Vadakkan *et al.*, 2005; Mogil, 2009; Lee-Kubli e Calcutt, 2014), assim este foi o modelo animal selecionado para trabalharmos durante este projeto. Buscamos também correlacionar os aspectos comportamentais dos animais com o estudo de fatores moleculares, objetivando-se assim obter resultados que se complementem em um estudo abrangente sobre a neurobiologia da dor crônica e a relação com o sistema motor induzida por pela Cisplatina.

A escolha da proteína quinase dependente de RNA (PKR) como objeto de estudo nos testes desenvolvidos durante este trabalho ocorreu devido a sua importância no ciclo celular, diferenciação, resposta ao estresse e modulação imune e ainda observada pela existência de moduladores diretos e indiretos específicos. A Cisplatina foi escolhida por ser reconhecidamente envolvida com mecanismos de neurotoxicidade periférica. Pataer e colaboradores (Pataer *et al.*, 2009) demonstram que PKR apresenta-se como um importante componente em vias de sinalização para a sobrevivência celular. Células tumorais apresentam níveis elevados dessa proteína, quando comparadas às normais. O nível elevado de PKR faz com que as vias de sobrevivência se sobreponham ao sinais pró-apoptóticos e a célula tumoral permanece viva. Esse pode ser um importante ponto no que diz respeito a resistência encontrada em muitos pacientes à diferentes classes antineoplásicas, bem como ao nível de agressividade do tumor em desenvolvimento.

Em situações de lesão tecidual, há aumento nos sinais de entrada e aumento da sensibilidade à estimulação no local do insulto. Isso é denominado hiperalgesia primária e é dependente mecanicamente do aumento da excitabilidade de nociceptores periféricos. Porém há uma sensibilidade aumentada aos estímulos no tecido não ferido adjacente ou a alguma distância do local da lesão. Isso é denominado hiperalgesia secundária e é dependente mecanicamente das mudanças na excitabilidade dos neurônios no sistema nervoso central (Urban e Gebhart, 1999; Gebhart, 2004). A investigação da presença de hiperalgesia e alodínia em nosso laboratório foram feitos respectivamente utilizando o teste Hargreaves e o teste com filamentos de Von Frey.

Em nossos testes, camundongos *knockout* para a proteína PKR apresentaram limiares maiores para a tolerância ao teste mecânico de Von Frey (Fig. 10A), quando confrontados aos animais selvagens. Quando fazemos a análise entre os animais selvagens tratados com cisplatina e seu grupo controle (salina) podemos observar que a sensibilização durante, e após, o tratamento apresenta diferenças, sendo essa diferença maior no período logo após o tratamento com cisplatina (dias 35 a 42). Por sua vez, camundongos PKR-/- tratados com cisplatina apresentaram, em suas duas primeiras semanas, uma pequena sensibilização quando comparados ao seu estado basal, não apresentando mais diferenças até o final da coleta de dados. A não existência de diferenças consideráveis entre o grupo PKR-/- cisplatina e PKR-/- salina demonstra que animais knockout não têm sensibilização mecânica igual aos animais selvagens tratados com cisplatina, demostrando que a PKR tem um efeito pró-nociceptivo.

Com relação ao teste de Hargreaves (Fig.10B) encontramos uma maior tolerância ao estímulo térmico nos animais que receberam apenas solução salina quando comparados àqueles que foram submetidos à injeções com o quimioterápico cisplatina, nesse experimento não houve influência significativa da proteína PKR. Esse resultado é compatível com demais estudos que avaliaram os efeitos do aumento da sensibilidade térmica (calor) em animais tratados com cisplatina. Ta e colaboradores (Ta *et al.*, 2009) indicam resultados semelhantes, que também demonstram os efeitos de redução do limiar sensitivo térmico em camundongos após a administração de cisplatina, os mesmos apresentaram, em média, uma redução de 30% desse limiar, quando comparados aos animais controles.

A partir dos resultados comportamentais realizamos a análise de detecção de proteínas específicas, envolvidas em mecanismos de gênese e manutenção da dor crônica foram coletados os gânglios da raiz dorsal em animais C57Black, tratados com a cisplatina ou com seu veículo. Escolhemos a linhagem C57 Black pois queríamos saber se havia alguma alteração de expressão dessas proteínas com o inibidor de PKR (PKRi) e sem o inibidor, fazendo assim uma análise farmacológica. Analisamos pela técnica de Western Blot a fosforilação das proteínas p38, JNK, ERK1,2 e do fator de transcrição STAT3.

Demostramos que a cisplatina tem efeito sobre a fosforilação de p38 e quando utilizamos o PKRi, no mesmo grupo, que são animais tratados Cisplatina não há uma redução da fosforilação quando comparado ao grupo sem o PKRi (Fig. 11A), esses dados são semelhantes a outros estudos, como no trabalho do pesquisador Praveen Anand (Anand *et al.*, 2011) que demostrou que a proteína quinase ativada por mitógenos p38 (MAPK) está envolvida na regulação e síntese de mediadores inflamatórios, sendo um dos causadores da dor neuropática.

Já nas proteínas MAPK, JNK e ERK1,2, não houve diferença entre o grupo controle (CTL), o grupo com cisplatina e os grupos que receberam PKRi (salina e cisplatina) demostrando que nessas proteínas não houve alteração a atividade destas vias pelo quimioterápico ou pela PKR (Fig. 11B e 11C).

No fator de transcrição STAT3, ocorreu um aumento de sua fosforilação nos grupos Cisplatina e Cisplatina com PKRi (Fig. 11D), demostrando sua alteração com relação ao quimioterápico mas não necessariamente com a proteína PKR.

Com intuito de avaliar viés comportamentais, realizamos a observação da atividade motora, por sua vez, foi realizada pelo teste com a barra rotatória (ou Rotarod)(Shiotsuki *et al.*, 2010). Em sua revisão literária, Brooks e colaboradores (Brooks *et al.*, 2012) que analisaram a deterioração da função motora normal dentro de um estado de doença sinaliza a progressão de um processo patológico subjacente e identifica pontos temporais sensíveis à doença de acordo com os quais o início dos testes terapêuticos pode ser agendado. A deterioração no desempenho das tarefas motoras também pode indicar o ponto em que os déficits motores começam a comprometer nossa capacidade de medir outros déficits dentro de domínios cognitivos e comportamentais. Em ensaios terapêuticos agudos, a separação do motor da função cognitiva ou comportamental pode ser crucial na

determinação da especificidade funcional do efeito do medicamento. Se quisermos medir com precisão o desempenho motor na progressão da doença ou durante os ensaios de drogas, os testes de função motora que foram altamente otimizados em relação à sensibilidade devem ser aplicados. Uma vez que a coordenação e o equilíbrio do motor são essenciais para a função do motor normal.

Nossos dados, durante o teste de Rotarod (Fig.13A), indicam um comprometimento motor maior em animais submetidos ao tratamento com cisplatina, quando comparados com animais que receberam apenas solução veículo. Essa análise foi realizada pelo número de quedas durante a caminhada dos animais pela barra giratória. Camundongos PKR-/- mostraram-se mais eficientes em se manterem equilibrados durante um maior período de tempo no equipamento, além de mostrarem taxas consideravelmente menores de fadiga ao teste (Fig. 13B).

Já os valores relativos à taxa metabólica (Fig.14), neste estudo, indicam que os gânglios da raiz dorsal (Fig.14B) provenientes de animais PKR-/- apresentaram uma maior taxa de respiração celular comparados ao seu controle, sustentando nossa hipótese inicial que a ausência da proteína PKR, possa de alguma forma, influenciar a taxa metabólica, bem como melhorar a eficiência respiratória celular. Por sua vez, animais tratados com cisplatina apresentaram um decréscimo para seus valores de consumo de oxigênio, sendo essa mais uma das debilidades provocadas pela utilização do quimioterápico. Animais tratados e com a presença de PKR apresentaram as menores taxas metabólicas. O consumo de oxigênio pelas células musculares (Fig.14A) também foi reduzido nos animais injetados com cisplatina, ao passo que animais PKR-/- apresentaram os melhores valores metabólicos em células extraídas do músculo *soleus*.

Os dados obtidos pela análise da taxa metabólica podem corroborar com a hipótese de que a ausência, ou inibição, da proteína PKR pode ser favorável em um quadro de estresse celular provocado pelo uso de quimioterápicos.

A utilização de cisplatina pode também, em muitos casos, provocar a perda de peso corporal. Dados literários indicam a tentativa de pesquisadores em reduzir estes efeitos. O estudo realizado por Sakai (Sakai *et al.*, 2014) mostrou que a perda de peso corporal era semelhante nos grupos controle e cisplatina, enquanto que a massa muscular era menor e a expressão de MuRF1 e MAFbx era maior nos animais tratados com cisplatina. Neste contexto, a hipótese era que a neuropatia

periférica pela cisplatina, acompanhada pela ativação das vias de sinalização, poderia, pelo menos em parte, contribuir para a atrofia muscular induzida por cisplatina. Esse dado corrobora nossos dados que indicam uma queda nos pesos dos animais submetidos ao tratamento com o quimioterápico tanto nos animais knockout, quanto nos camundongos selvagens para essa proteína (esses mostraram uma queda mais acentuada) durante todo o período das aplicações. Após a interrupção do tratamento os animais voltam a ganhar peso, alcançando valores próximos aos camundongos que receberam apenas veículo (Fig.12).

Essa perda de peso poderia estar relacionada a um provável excesso de proteólise ou com a redução da síntese proteica que ocorre nos animais tratados com o quimioterápico cisplatina, como indica resultados obtidos da massa muscular (Fig.15A) que demostra a perda da massa principalmente em animais PKR +/+ tratado com cisplatina.

A análise dos níveis de fosforilação de proteínas envolvidas com a degradação ou síntese proteica nos animais tratados com cisplatina (Fig.15B e C), mostram que não houve mudança significativa na proteólise, mas sim na síntese, indicada pela alteração da atividade da proteína S6 (Ser235 / 236) que serve de marcador para síntese, pois tem influência positiva no complexo de tradução e aumento da célula muscular. Ativação de S6, e posterior fosforilação de seus alvos a jusante também é necessária para estimular otimamente a síntese protéica. Além disso, observamos níveis maiores da forma fosforilada de FoxO 1 e 4 nas células de animais controle (Fig. 16A). Quando fosforilada, essa proteína saí do núcleo e cessa sua atuação como fator de transcrição para genes envolvidos com o catabolismo proteico (MuRF1 e atrogina-1) (Sandri *et al.*, 2004).

Animais tratados com cisplatina também apresentam níveis reduzidos de fosforilação de proteínas envolvidas com a via Akt/mTOR, (sinalização essa classicamente envolvida com processos de anabolismo muscular). Podemos inferir, desse modo, que vias de sinalização intracelular relacionadas com a síntese do músculo esquelético podem ser influenciadas pela utilização do quimioterápico cisplatina. Estes dados corroboram com os valores obtidos, neste projeto, em testes da atividade motora com Rotarod (Fig.13A) e de força (Fig.13C) realizados em animais que receberam tratamento quimioterápico.

Camundongos PKR +/+ que receberam cisplatina exibiram níveis de força muscular e atividade mecânica menores que os camundongos PKR -/- com o mesmo tratamento. Essa queda pode estar relacionada justamente à perda de massa muscular dos animais tratados com cisplatina e sua relação com a proteína PKR. Vale ressaltar que a atividade respiratória mitocondrial dos músculos de animais em quimioterapia também apresentou resultados menores aos seus controles, favorecendo eventos de fadiga (que realmente foi maior nesses animais, como indicado no Fig.13B).

Dessa forma a análise comportamental de comparar resultados obtidos por animais knockout para a proteína PKR em testes de alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, juntamente com dados relativos ao estado de respiração celular e fosforilação de determinadas proteínas podem indicar possíveis correlações entre o estado fisiológico de animais submetidos ao tratamento com o quimioterápico cisplatina, delineando, assim, possíveis alterações que sejam resultado da presença (ou não) de PKR, após estresse celular provocado pela utilização de cisplatina.

6 Conclusão

Os experimentos desenvolvidos durante este projeto apontam a proteína PKR como um importante componente das vias intracelulares de modulação da dor. Os resultados até agora obtidos nos permitem dizer que animais knockout para a proteína em questão apresentam um menor desenvolvimento dos efeitos colaterais característicos do tratamento com o quimioterápico cisplatina.

A proteína PKR é componente essencial para a ativação de vias intracelulares responsáveis pela inflamação de tecidos e geração de impulsos nociceptivos. Tais vias podem estar mais ativas após a administração de certas classes farmacológicas, sobretudo quimioterápicos como a cisplatina, um importante fármaco empregado contra tumores sólidos, mas responsável pelo desenvolvimento de alterações neurossensoriais (justamente por criar o estresse celular que ativa a proteína PKR e desencadeia a formação de compostos pró-inflamatórios). A importância desse estudo reside no fato de minimizar os possíveis efeitos danosos dos atuais tratamentos quimioterápicos. Esse evento pode ser obtido pela continuidade de estudos que desenvolvam compostos que inibam a ativação de PKR, mesmo em um ambiente de estresse celular, e assim possam reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e pró-nociceptivas, além de minimizar lesões aos componentes sensoriais que dão origem às alodínias e dores crônicas.

Referências bibliográficas[1]

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002AKERLEY, W. Paclitaxel in advanced non-small cell lung cancer : an alternative high-dose weekly schedule. **Chest,** v. 117, n. 4 Suppl 1, p. 152S-155S, Apr 2000. ISSN 0012-3692. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777471 >.

ANAND, P. et al. Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor dilmapimod in neuropathic pain following nerve injury. **Eur J Pain,** v. 15, n. 10, p. 1040-8, Nov 2011. ISSN 1090-3801. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpain.2011.04.005 >.

ASHBURN, M. A.; LIPMAN, A. G. Management of pain in the cancer patient. **Anesth Analg,** v. 76, n. 2, p. 402-16, Feb 1993. ISSN 0003-2999. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8424523 >.

BANERJEE, A.; GUTTRIDGE, D. C. Mechanisms for maintaining muscle. **Curr Opin Support Palliat Care,** v. 6, n. 4, p. 451-6, Dec 2012. ISSN 1751-4258. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1097/SPC.0b013e328359b681 >.

BARALDI, F. G. et al. The combination of conjugated linoleic acid (CLA) and extra virgin olive oil increases mitochondrial and body metabolism and prevents CLA-associated insulin resistance and liver hypertrophy in C57Bl/6 mice. **J Nutr Biochem,** v. 28, p. 147-54, Feb 2016. ISSN 0955-2863. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.10.008 >.

BASILE, U. Grip-Strength Meter (mice and rats). 2017. Disponível em: < http://www.ugobasile.com/products/catalogue/motory-coordination-grip-strength-activity/item/76-47200-grip-strength-meter-mice-and-rats.html >.

BATES, D. E.; BEAUMONT, S. J.; BAYLIS, B. W. Ototoxicity induced by gentamicin and furosemide. **Ann Pharmacother,** v. 36, n. 3, p. 446-51, Mar 2002. ISSN 1060-0280 (Print)1060-0280. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1345/aph.1A216 >.

BECHET, D. et al. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 37, n. 10, p. 2098-114, Oct 2005. ISSN 1357-2725 (Print)1357-2725. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.029 >.

[1] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

BENEDETTI, M. et al. Plasma corticosterone levels in mouse models of pain. **Eur J Pain,** v. 16, n. 6, p. 803-15, Jul 2012. ISSN 1090-3801. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/j.1532-2149.2011.00066.x >.

BIANCO, M. R. et al. Neuropathic pain and reactive gliosis are reversed by dialdehydic compound in neuropathic pain rat models. **Neurosci Lett,** v. 530, n. 1, p. 85-90, Nov 14 2012. ISSN 0304-3940. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.088 >.

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science,** v. 294, n. 5547, p. 1704-8, Nov 23 2001. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1126/science.1065874 >.

_____. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol,** v. 3, n. 11, p. 1014-9, Nov 2001. ISSN 1465-7392 (Print)1465-7392. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/ncb1101-1014 >.

BROOKS, S. P.; TRUEMAN, R. C.; DUNNETT, S. B. Assessment of Motor Coordination and Balance in Mice Using the Rotarod, Elevated Bridge, and Footprint Tests. **Curr Protoc Mouse Biol,** v. 2, n. 1, p. 37-53, Mar 01 2012. ISSN 2161-2617 (Print)2161-2617. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/9780470942390.mo110165 >.

BROWN, T. et al. A phase I trial of taxol given by a 6-hour intravenous infusion. **J Clin Oncol,** v. 9, n. 7, p. 1261-7, Jul 1991. ISSN 0732-183X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1675263 >.

CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neurosci Lett,** v. 596, p. 90-107, Jun 02 2015. ISSN 0304-3940. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.014 >.

CATA, J. P. et al. Altered discharges of spinal wide dynamic range neurons and down-regulation of glutamate transporter expression in rats with paclitaxel-induced hyperalgesia. **Neuroscience,** v. 138, n. 1, p. 329-38, 2006. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.009 >.

CAVALETTI, G. et al. Peripheral neurotoxicity of taxol in patients previously treated with cisplatin. **Cancer,** v. 75, n. 5, p. 1141-50, Mar 01 1995. ISSN 0008-543X (Print)0008-543x. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

CHAPLAN, S. R.; MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 280, n. 2, p. 829-38, Feb 1997. ISSN 0022-3565 (Print)0022-3565. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

CHAUDHRY, V. et al. Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: clinical and electrophysiological studies. **Ann Neurol,** v. 35, n. 3, p. 304-11, Mar 1994. ISSN 0364-5134 (Print)0364-5134. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/ana.410350310 >.

CHIORAZZI, A.; SEMPERBONI, S.; MARMIROLI, P. Current View in Platinum Drug Mechanisms of Peripheral Neurotoxicity. **Toxics,** v. 3, n. 3, p. 304-321, Aug 07 2015. ISSN 2305-6304. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3390/toxics3030304 >.

CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. **J Neurosci,** v. 17, n. 10, p. 3503-14, May 15 1997. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

DICKINSON, T. et al. Leading the charge--pioneering treatments in the fight against neuropathic pain. **Trends Pharmacol Sci,** v. 24, n. 11, p. 555-7, Nov 2003. ISSN 0165-6147 (Print)0165-6147. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2003.09.013 >.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** v. 20, p. 441-62, 1980. ISSN 0362-1642 (Print)0362-1642. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pa.20.040180.002301 >.

ERSAHIN, T.; TUNCBAG, N.; CETIN-ATALAY, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Mol Biosyst,** v. 11, n. 7, p. 1946-54, Jul 2015. ISSN 1742-2051. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1039/c5mb00101c >.

FEDOR, J. G. et al. Correlating kinetic and structural data on ubiquinone binding and reduction by respiratory complex I. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Nov 13 2017. ISSN 0027-8424. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1714074114 >.

FERREIRA, M. et al. Cadeia Respiratória Mitocondrial Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Défice do Complexo I. **Arq Med,** v. 22, n. 2-3, p. 49-56, 00/2008 2008. ISSN 0871-3413. Disponível em: < http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0871-34132008000200004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >.Disponível em: < http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-

34132008000200004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt >.Disponível em: < http://www.scielo.mec.pt/pdf/am/v22n2-3/22n2-3a04.pdf >.

FORMAN, A. Peripheral neuropathy in cancer patients: clinical types, etiology, and presentation. Part 2. **Oncology (Williston Park),** v. 4, n. 2, p. 85-9, Feb 1990a. ISSN 0890-9091 (Print)0890-9091. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

_____. Peripheral neuropathy in cancer patients: incidence, features, and pathophysiology. **Oncology (Williston Park),** v. 4, n. 1, p. 57-62 concl, Jan 1990b. ISSN 0890-9091 (Print)0890-9091. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

GARCIA, M. A. et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 70, n. 4, p. 1032-60, Dec 2006. ISSN 1092-2172 (Print)1092-2172. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1128/mmbr.00027-06 >.

GEBHART, G. F. Descending modulation of pain. **Neurosci Biobehav Rev,** v. 27, n. 8, p. 729-37, Jan 2004. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.008 >.

GIL, J.; ALCAMI, J.; ESTEBAN, M. Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. **Oncogene,** v. 19, n. 11, p. 1369-78, Mar 09 2000. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1203448 >.

GIL, J. et al. TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. **Mol Cell Biol,** v. 24, n. 10, p. 4502-12, May 2004. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

GOLL, D. E. et al. The calpain system. **Physiol Rev,** v. 83, n. 3, p. 731-801, Jul 2003. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00029.2002 >.

GONCALVES, D. A. et al. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat *soleus* muscles independently of Akt. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 302, n. 1, p. E123-33, Jan 01 2012. ISSN 0193-1849. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00188.2011 >.

GONÇALVES, M. S. et al. Mechanisms of cisplatin ototoxicity: theoretical review. 2013.

GREGG, R. W. et al. Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. **J Clin Oncol,** v. 10, n. 5, p. 795-803, May 1992. ISSN 0732-183X (Print)0732-183x. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1200/jco.1992.10.5.795 >.

HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain,** v. 32, n. 1, p. 77-88, Jan 1988. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

HARTMANN, J. T.; LIPP, H. P. Toxicity of platinum compounds. **Expert Opin Pharmacother,** v. 4, n. 6, p. 889-901, Jun 2003. ISSN 1465-6566 (Print)1465-6566. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1517/14656566.4.6.889 >.

HAYWARD, P. Microglial role in neuropathic pain. **Lancet Neurol,** v. 5, n. 2, p. 118-9, Feb 2006. ISSN 1474-4422 (Print)1474-4422. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

HINKLE, P. C. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. **Biochim Biophys Acta,** v. 1706, n. 1-2, p. 1-11, Jan 07 2005. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabio.2004.09.004 >.

HOKFELT, T.; ZHANG, X.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. **Trends Neurosci,** v. 17, n. 1, p. 22-30, Jan 1994. ISSN 0166-2236 (Print)0166-2236. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

HONORE, P. et al. Neurochemical plasticity in persistent inflammatory pain. **Prog Brain Res,** v. 129, p. 357-63, 2000. ISSN 0079-6123 (Print)0079-6123. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123(00)29027-4 >.

HUANG, G. J. et al. Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of ergostatrien-3beta-ol from Antrodia camphorata submerged whole broth in mice. **J Agric Food Chem,** v. 58, n. 12, p. 7445-52, Jun 23 2010. ISSN 0021-8561. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/jf1013764 >.

HYPPOLITO, M. A. et al. [Amifostine otoprotection to cisplatin ototoxicity: a guinea pig study using otoacoustic emission distortion products (DPOEA) and scanning electron microscopy]. **Braz J Otorhinolaryngol,** v. 71, n. 3, p. 268-73, May-Jun 2005. ISSN 1808-8694 (Print)1808-8686. Disponível em: < http://dx.doi.org//S0034-72992005000300002 >.

JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 287, n. 4, p. C834-43, Oct 2004. ISSN 0363-

6143 (Print)0363-6143. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00579.2003 >.

JI, R. R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y. Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science,** v. 354, n. 6312, p. 572-577, Nov 04 2016. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf8924 >.

JI, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Sci STKE,** v. 2004, n. 252, p. reE14, Sep 21 2004. ISSN 1525-8882. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1126/stke.2522004re14 >.

JI, R. R.; SUTER, M. R. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. In: (Ed.). **Mol Pain**, v.3, 2007. p.33. ISBN 1744-8069 (Electronic).

KARASAWA, T.; STEYGER, P. S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. **Toxicol Lett,** v. 237, n. 3, p. 219-27, Sep 17 2015. ISSN 0378-4274. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.06.012 >.

KHAN, S. et al. Mechanism underlying anti-hyperalgesic and anti-allodynic properties of anomalin in both acute and chronic inflammatory pain models in mice through inhibition of NF-kappaB, MAPKs and CREB signaling cascades. **Eur J Pharmacol,** v. 718, n. 1-3, p. 448-58, Oct 15 2013. ISSN 0014-2999. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.07.039 >.

LA GUARDIA, P. G. et al. Protection of rat skeletal muscle fibers by either L-carnitine or coenzyme Q10 against statins toxicity mediated by mitochondrial reactive oxygen generation. **Front Physiol,** v. 4, p. 103, 2013. ISSN 1664-042X (Print)1664-042x. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2013.00103 >.

LAI, J. et al. Neuropathic pain: the paradox of dynorphin. **Mol Interv,** v. 1, n. 3, p. 160-7, Aug 2001. ISSN 1534-0384 (Print)1534-0384. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

LAIRD, J. M.; BENNETT, G. J. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. **J Neurophysiol,** v. 69, n. 6, p. 2072-85, Jun 1993. ISSN 0022-3077 (Print)0022-3077. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **J Am Soc Nephrol,** v. 17, n. 7, p. 1807-19, Jul 2006. ISSN 1046-6673 (Print)1046-6673. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1681/asn.2006010083 >.

LEE-KUBLI, C. A.; CALCUTT, N. A. Painful neuropathy: Mechanisms. **Handb Clin Neurol,** v. 126, p. 533-57, 2014. ISSN 0072-9752 (Print)0072-9752. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-53480-4.00034-5 >.

LEVER, I. et al. Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. **Eur J Neurosci,** v. 18, n. 5, p. 1169-74, Sep 2003. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

LI, Q. et al. The effect of lipocisplatin on cisplatin efficacy and nephrotoxicity in malignant breast cancer treatment. **Biomaterials,** v. 35, n. 24, p. 6462-72, Aug 2014. ISSN 0142-9612. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.023 >.

LI, Y.; WOMER, R. B.; SILBER, J. H. Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose. **Eur J Cancer,** v. 40, n. 16, p. 2445-51, Nov 2004. ISSN 0959-8049 (Print)0959-8049. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2003.08.009 >.

LIPTON, R. B. et al. Taxol produces a predominantly sensory neuropathy. **Neurology,** v. 39, n. 3, p. 368-73, Mar 1989. ISSN 0028-3878 (Print)0028-3878. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

LO, E. J. et al. Bradykinin-induced neurogenic migration of neutrophils into the rat knee joint. **Neuroreport,** v. 10, n. 18, p. 3821-4, Dec 16 1999. ISSN 0959-4965 (Print)0959-4965. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MA, W.; QUIRION, R. Increased phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) in the superficial dorsal horn neurons following partial sciatic nerve ligation. **Pain,** v. 93, n. 3, p. 295-301, Sep 2001. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MACLENNAN, A. J. et al. In vivo localization and characterization of functional ciliary neurotrophic factor receptors which utilize JAK-STAT signaling. **Neuroscience,** v. 99, n. 4, p. 761-72, 2000. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MALCANGIO, M.; LESSMANN, V. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. **Trends Pharmacol Sci,** v. 24, n. 3, p. 116-21, Mar 2003. ISSN 0165-6147 (Print)0165-6147. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/s0165-6147(03)00025-7 >.

MALICDAN, M. C. et al. Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. **Neuromuscul Disord,** v. 18, n. 7, p. 521-9,

Jul 2008. ISSN 0960-8966 (Print)0960-8966. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2008.04.010 >.

MALMBERG, A. B.; BASBAUM, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain,** v. 76, n. 1-2, p. 215-22, May 1998. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MAMMUCARI, C. et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. **Cell Metab,** v. 6, n. 6, p. 458-71, Dec 2007. ISSN 1550-4131 (Print)1550-4131. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.001 >.

MANNION, R. J. et al. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 96, n. 16, p. 9385-90, Aug 03 1999. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MANTYH, P. W. et al. Molecular mechanisms of cancer pain. **Nat Rev Cancer,** v. 2, n. 3, p. 201-9, Mar 2002. ISSN 1474-175X (Print)1474-175x. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/nrc747 >.

MARCHAL, J. A. et al. The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer. **Faseb j,** v. 28, n. 5, p. 1965-74, May 2014. ISSN 0892-6638. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1096/fj.13-248294 >.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci,** v. 6, n. 7, p. 521-32, Jul 2005. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/nrn1700 >.

MATZNER, O.; DEVOR, M. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na+ channels. **J Neurophysiol,** v. 72, n. 1, p. 349-59, Jul 1994. ISSN 0022-3077 (Print)0022-3077. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MCGUIRE, W. P. et al. Comparison of combination therapy with paclitaxel and cisplatin versus cyclophosphamide and cisplatin in patients with suboptimal stage III and stage IV ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. **Semin Oncol,** v. 24, n. 1 Suppl 2, p. S2-13-s2-16, Feb 1997. ISSN 0093-7754 (Print)0093-7754. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MILETIC, G.; HANSON, E. N.; MILETIC, V. Brain-derived neurotrophic factor-elicited or sciatic ligation-associated phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the rat spinal dorsal horn is reduced by block of tyrosine kinase

receptors. **Neurosci Lett,** v. 361, n. 1-3, p. 269-71, May 06 2004. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.029 >.

MILETIC, G. et al. Protein kinase A contributes to sciatic ligation-associated early activation of cyclic AMP response element binding protein in the rat spinal dorsal horn. **Neurosci Lett,** v. 360, n. 3, p. 149-52, Apr 29 2004. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.060 >.

MILETIC, G.; PANKRATZ, M. T.; MILETIC, V. Increases in the phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and decreases in the content of calcineurin accompany thermal hyperalgesia following chronic constriction injury in rats. **Pain,** v. 99, n. 3, p. 493-500, Oct 2002. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol,** v. 57, n. 1, p. 1-164, Jan 1999. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

MILLER, R. P. et al. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. **Toxins (Basel),** v. 2, n. 11, p. 2490-518, Nov 2010. ISSN 2072-6651. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.3390/toxins2112490 >.

MIYABE, T.; MILETIC, V. Multiple kinase pathways mediate the early sciatic ligation-associated activation of CREB in the rat spinal dorsal horn. **Neurosci Lett,** v. 381, n. 1-2, p. 80-5, Jun 10-17 2005. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2005.02.001 >.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat Rev Neurosci,** v. 10, n. 4, p. 283-94, Apr 2009. ISSN 1471-003x. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/nrn2606 >.

MOORE, K. A.; BABA, H.; WOOLF, C. J. Synaptic transmission and plasticity in the superficial dorsal horn. **Prog Brain Res,** v. 129, p. 63-80, 2000. ISSN 0079-6123 (Print)0079-6123. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/s0079-6123(00)29006-7 >.

NEIJT, J. P. et al. Exploratory phase III study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. **J Clin Oncol,** v. 18, n. 17, p. 3084-92, Sep 2000. ISSN 0732-183X (Print)0732-183x. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1200/jco.2000.18.17.3084 >.

NELSON, D. L.; COX, M. M. ***Princípios de Bioquímica de Lehninger***. 6 ed. Porto Alegre: 2014. 1328 p.

OMANA-ZAPATA, I. et al. Tetrodotoxin inhibits neuropathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons. **Pain,** v. 72, n. 1-2, p. 41-9, Aug 1997. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

OZKOK, A.; EDELSTEIN, C. L. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. **Biomed Res Int,** v. 2014, p. 967826, 2014. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1155/2014/967826 >.

PACE, A. et al. Paclitaxel neurotoxicity: clinical and neurophysiological study of 23 patients. **Ital J Neurol Sci,** v. 18, n. 2, p. 73-9, Apr 1997. ISSN 0392-0461 (Print)0392-0461. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

PALECKOVA, V. et al. The non-NMDA antagonist CNQX prevents release of amino acids into the rat spinal cord dorsal horn evoked by sciatic nerve stimulation. **Neurosci Lett,** v. 148, n. 1-2, p. 19-22, Dec 14 1992. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

PAN, H. et al. Mitochondrial modulation by Epigallocatechin 3-Gallate ameliorates cisplatin induced renal injury through decreasing oxidative/nitrative stress, inflammation and NF-kB in mice. **PLoS One,** v. 10, n. 4, p. e0124775, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124775 >.

PATAER, A. et al. Inhibition of RNA-dependent protein kinase (PKR) leads to cancer cell death and increases chemosensitivity. **Cancer Biol Ther,** v. 8, n. 3, p. 245-52, Feb 2009. ISSN 1538-4047. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

PATRICK, D. L. et al. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Symptom management in cancer: pain, depression, and fatigue, July 15-17, 2002. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 32, p. 9-16, 2004. ISSN 1052-6773 (Print)1052-6773. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1093/jncimonographs/djg014 >.

PEREZ, R. M. et al. Neuropharmacological activity of Solanum nigrum fruit. **J Ethnopharmacol,** v. 62, n. 1, p. 43-8, Aug 1998. ISSN 0378-8741 (Print)0378-8741. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

PODRATZ, J. L. et al. Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. **Neurobiol Dis,** v. 41, n. 3, p. 661-8, Mar 2011. ISSN 0969-9961. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2010.11.017 >.

QIU, J. et al. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. **J Neurosci,** v. 25, n. 7, p. 1645-

53, Feb 16 2005. ISSN 0270-6474. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3269-04.2005 >.

RAMESH, G.; REEVES, W. B. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 285, n. 4, p. F610-8, Oct 2003. ISSN 1931-857X (Print)1522-1466. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00101.2003 >.

ROSSATO, F. A. et al. Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non-tumorigenic melan-a cells associated with inhibition of mitochondrial respiration. **PLoS One,** v. 9, n. 6, p. e101060, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101060 >.

SAKAI, H. et al. Mechanisms of cisplatin-induced muscle atrophy. **Toxicol Appl Pharmacol,** v. 278, n. 2, p. 190-9, Jul 15 2014. ISSN 0041-008x. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.05.001 >.

SALEH, S.; EL-DEMERDASH, E. Protective effects of L-arginine against cisplatin-induced renal oxidative stress and toxicity: role of nitric oxide. **Basic Clin Pharmacol Toxicol,** v. 97, n. 2, p. 91-7, Aug 2005. ISSN 1742-7835 (Print)1742-7835. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_114.x >.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell,** v. 117, n. 3, p. 399-412, Apr 30 2004. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

SANTOS NA , E. A. O eliminador de radicais de hidroxilo melhora a nefrotoxicidade induzida por cisplatina, prevenindo o estresse oxidativo, desequilíbrio do estado redox, comprometimento do energeti ... - PubMed - NCBI. 2017. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ >.

SCHARFF, R.; WOOL, I. G. CONCENTRATION OF AMINO ACIDS IN RAT MUSCLE AND PLASMA. **Nature,** v. 202, p. 603-4, May 09 1964. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci,** v. 5 Suppl, p. 1062-7, Nov 2002. ISSN 1097-6256 (Print)1097-6256. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/nn942 >.

SCHWAIGER, F. W. et al. Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT).

Eur J Neurosci, v. 12, n. 4, p. 1165-76, Apr 2000. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

SEKELLICK, M. J. et al. Transient resistance of influenza virus to interferon action attributed to random multiple packaging and activity of NS genes. **J Interferon Cytokine Res,** v. 20, n. 11, p. 963-70, Nov 2000. ISSN 1079-9907 (Print)1079-9907. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1089/10799900050198408 >.

SHIOTSUKI, H. et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **J Neurosci Methods,** v. 189, n. 2, p. 180-5, Jun 15 2010. ISSN 0165-0270. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026 >.

TA, L. E.; LOW, P. A.; WINDEBANK, A. J. Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli. 2009 2009. Disponível em: < http://www.myendnoteweb.com/EndNoteWeb.html?func=shownotice& >.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. **J Biol Chem,** v. 279, n. 46, p. 47704-10, Nov 12 2004. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M407016200 >.

TSUDA, M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. **J Diabetes Investig,** v. 7, n. 1, p. 17-26, Jan 2016. ISSN 2040-1116. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/jdi.12379 >.

TSUDA, M.; INOUE, K.; SALTER, M. W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. **Trends Neurosci,** v. 28, n. 2, p. 101-7, Feb 2005. ISSN 0166-2236 (Print)0166-2236. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2004.12.002 >.

TSUDA, M. et al. Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex. **J Neurochem,** v. 141, n. 4, p. 486-498, May 2017. ISSN 0022-3042. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/jnc.14001 >.

UEDA, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. **Pharmacol Ther,** v. 109, n. 1-2, p. 57-77, Jan 2006. ISSN 0163-7258 (Print)0163-7258. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.06.003 >.

URBAN, M. O.; GEBHART, G. F. Central mechanisms in pain. **Med Clin North Am,** v. 83, n. 3, p. 585-96, May 1999. ISSN 0025-7125 (Print)0025-7125. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

URSO, M. L. Disuse atrophy of human skeletal muscle: cell signaling and potential interventions. **Med Sci Sports Exerc,** v. 41, n. 10, p. 1860-8, Oct 2009. ISSN 0195-9131. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181a6458a >.

VADAKKAN, K. I.; JIA, Y. H.; ZHUO, M. A behavioral model of neuropathic pain induced by ligation of the common peroneal nerve in mice. **J Pain,** v. 6, n. 11, p. 747-56, Nov 2005. ISSN 1526-5900 (Print)1526-5900. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2005.07.005 >.

VAUGHN, L. S. et al. Altered activation of protein kinase PKR and enhanced apoptosis in dystonia cells carrying a mutation in PKR activator protein PACT. **J Biol Chem,** v. 290, n. 37, p. 22543-57, Sep 11 2015. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.669408 >.

VON FREY, M. **Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org,** v. 106, n. 1-4, p. 1-5, Dec 1925. ISSN 0043-5546 (Print)0043-5546. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/bf02079523 >.

WAALKES, T. P.; UDENFRIEND, S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **J Lab Clin Med,** v. 50, n. 5, p. 733-6, Nov 1957. ISSN 0022-2143 (Print)0022-2143. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov,** v. 4, n. 4, p. 307-20, Apr 2005. ISSN 1474-1776 (Print)1474-1776. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/nrd1691 >.

WANG, Z. et al. mTOR in viral hepatitis and hepatocellular carcinoma: function and treatment. **Biomed Res Int,** v. 2014, p. 735672, 2014. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1155/2014/735672 >.

WENDT, A.; THOMPSON, V. F.; GOLL, D. E. Interaction of calpastatin with calpain: a review. **Biol Chem,** v. 385, n. 6, p. 465-72, Jun 2004. ISSN 1431-6730 (Print)1431-6730. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1515/bc.2004.054 >.

WILLIAMS, B. R. Signal integration via PKR. **Sci STKE,** v. 2001, n. 89, p. re2, Jul 03 2001. ISSN 1525-8882. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1126/stke.2001.89.re2 >.

WINDEBANK, A. J.; GRISOLD, W. Chemotherapy-induced neuropathy. **J Peripher Nerv Syst,** v. 13, n. 1, p. 27-46, Mar 2008. ISSN 1085-9489. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8027.2008.00156.x >.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science,** v. 288, n. 5472, p. 1765-9, Jun 09 2000. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

XU, M. et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase regulates the motility of breast cancer cells. **PLoS One,** v. 7, n. 10, p. e47721, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047721 >.

YAMAUCHI, K. et al. Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice. **J Neurochem,** v. 96, n. 4, p. 1060-70, Feb 2006. ISSN 0022-3042 (Print)0022-3042. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03559.x >.

ZETTER, B. R.; MANGOLD, U. Ubiquitin-independent degradation and its implication in cancer. **Future Oncol,** v. 1, n. 5, p. 567-70, Oct 2005. ISSN 1479-6694 (Print)1479-6694. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.2217/14796694.1.5.567 >.

ZHANG, X. et al. Regulation of expression of galanin and galanin receptors in dorsal root ganglia and spinal cord after axotomy and inflammation. **Ann N Y Acad Sci,** v. 863, p. 402-13, Dec 21 1998. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

ZHAO, J. et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. **Cell Metab,** v. 6, n. 6, p. 472-83, Dec 2007. ISSN 1550-4131 (Print)1550-4131. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.004 >.

ZHENG, F. Y.; XIAO, W. H.; BENNETT, G. J. The response of spinal microglia to chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies is distinct from that evoked by traumatic nerve injuries. **Neuroscience,** v. 176, p. 447-54, Mar 10 2011. ISSN 0306-4522. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.052 >.

ZHU, S. et al. DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Arch Toxicol,** v. 89, n. 12, p. 2197-205, Dec 2015. ISSN 0340-5761. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00204-015-1633-3 >.

ZHUANG, Z. Y. et al. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this

neuropathic pain model. **Pain,** v. 114, n. 1-2, p. 149-59, Mar 2005. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2004.12.022 >.

ZIEGLGANSBERGER, W.; BERTHELE, A.; TOLLE, T. R. Understanding neuropathic pain. **CNS Spectr,** v. 10, n. 4, p. 298-308, Apr 2005. ISSN 1092-8529 (Print)1092-8529. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain,** v. 16, n. 2, p. 109-10, Jun 1983. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

_____. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol,** v. 429, n. 1-3, p. 23-37, Oct 19 2001. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

Anexo

Aprovação do projeto "Ação da proteína quinase dependente de RNA na neurobiologia da dor crônica provocada pelo tratamento com quimioterápico" comissão de ética para análise de projetos de pesquisa do FMRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética no Uso de Animais
(16) 3315-3301

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o projeto de pesquisa intitulado: *"Ação da proteína quinase dependente de RNA na neurobiologia da dor crônica provocada pelo tratamento com quimioterápico"*, sob responsabilidade do **Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas**, protocolado sob **nº 188/2016,** foi submetido para avaliação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na data de 11 de outubro de 2016 encontrando-se ainda em análise.

Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, aos 30 de março de 2017.

Fabiana Maria C. P. Correa de Melo
Secretária da CEUA-FMRP-USP

Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo
☎: (16)3315-3301