

## CHEMOBRAIN EM RATOS – ESTUDO COMPORTAMENTAL, MORFOLÓGICO E DA RESPOSTA OXIDATIVA E INFLAMATÓRIA INDUZIDA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELO QUIMIOTERÁPICO DOXORRUBICINA EM RATOS WISTAR

Isabelle Bolognese Santa Brigida (IC); Eder de Carvalho Pincinato (Orientador).

**Apoio: PIVIC Mackenzie**

### RESUMO

O cloridrato de doxorubicina é um agente quimioterápico que tem sido usado com êxito para produzir regressão em várias neoplasias. Os mecanismos pelos quais exerce alguns efeitos neurotóxicos colaterais, induzindo prejuízo cognitivo e promovendo alterações estruturais no encéfalo, permanecem ainda obscuros. O presente estudo visa analisar, se a DOX poderia induzir efeitos comportamentais, morfológicos, oxidativos e inflamatórios em ratos submetidos a um tratamento com este agente. Os ratos foram divididos em dois grupos: DOX, tratados com doxorubicina durante 4 semanas e grupo controle, tratados com solução salina 0,9% durante o mesmo período. Para avaliar os parâmetros comportamentais utilizou-se dos testes de campo aberto, de labirinto em cruz elevado, de reconhecimento de objetos e de preferência social. Os parâmetros indicadores de estresse oxidativo do tecido nervoso foram NO (óxido nítrico), SOD (superóxido dismutase), catalase, GR (glutathione redutase) e GPx (glutathione peroxidase) e extensão da oxidação lipídica. Também se avaliou atividade de algumas das citocinas inflamatórias. A análise morfológica foi realizada por microscopia de luz a partir de cortes corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina e luxol fast blue, e por imunohistoquímica para o marcador astrocitário GFAP. Verificou-se nos ratos tratados com DOX, aumento na produção de TBARS, NO, níveis de GR, das IL-6, IL-8 e de CXCL1 e na expressão de GFAP; com concomitante diminuição nos níveis de GSSG, ferritina e da IL-10; sobre os parâmetros comportamentais, observou-se o menor tempo de interação com o objeto novo, sendo o mesmo tempo de interação com o objeto antigo, em comparação ao grupo controle.

**Palavras-chave:** Doxorubicina. Ratos. Sistema Nervoso Central.

### ABSTRACT

Doxorubicin hydrochloride is a chemotherapeutic agent that has been successfully used to produce regression in various cancers. The mechanisms by which it exerts some side neurotoxic effects, inducing cognitive impairment and promoting structural changes in the brain, remain still obscure. The present study aims to analyze, if DOX can cause behavioral, morphological, oxidative and inflammatory damage in rats undergoing treatment with this agent. The rats were divided into two groups: DOX, treated with doxorubicin for 4 weeks and group control, treated with 0.9% saline over the same period. To evaluate the behavioral parameters, we used the open field, high cross maze, object recognition and social preference

tests. Indicative parameters of oxidative stress of nervous tissue were NO (nitric oxide), SOD (superoxide dismutase), catalase, GR (glutathione reductase), GPx (glutathione peroxidase) and extension of lipid peroxidation. Activity of some of the inflammatory cytokines was also evaluated. Morphological analysis was performed by light microscopy from sections stained by hematoxylin-eosin and luxol fast blue techniques, and by immunohistochemistry for the astrocytic marker GFAP. In DOX-treated mice were found, increase in the production of TBARS, NO, levels of GR, IL-6, IL-8 and CXCL1 and in GFAP expression; with concomitant decrease in the levels of GSSG, ferritin and IL-10; about the behavioral parameters, the shortest interaction time with the new object was observed, being the same time of interaction with the old object, compared to the control group.

**Keywords:** Doxorubicin. Rats. Central Nervous System.

## 1. INTRODUÇÃO

A quimioterapia tem sido extremamente bem-sucedida no tratamento de muitas formas de câncer e na melhoria das taxas de sobrevivência dos pacientes. Com o número crescente de sobreviventes, uma série de efeitos colaterais cognitivos se tornaram aparentes. Estes foram chamados "chemobrain" (ou disfunção cognitiva induzida pela quimioterapia) entre os grupos de pacientes que descrevem os sintomas como um declínio na memória e na concentração para as funções executadas diariamente (HALLE; MOORE, 2014; KAISER et al., 2014; WANG et al., 2015; TAILLIBERT et al., 2016). Este efeito colateral da quimioterapia sobre as funções cognitivas não foi antecipado pelos oncologistas, uma vez que se supunha que os agentes quimioterápicos, administrados sistemicamente, não podiam atravessar a barreira hematoencefálica, acreditando-se, assim, que o encéfalo estava, portanto, protegido da sua ação. Hoje, sabe-se que baixas concentrações de muitos agentes quimioterápicos atravessam a barreira hematoencefálica e, mesmo aqueles que são completamente impedidos de o fazer, podem induzir a produção de citocinas inflamatórias em tecidos periféricos, as quais, por sua vez podem atravessar essa barreira (VARDY; TANNOCK, 2007).

Tais alterações, embora sutis, podem causar angústia significativa entre os pacientes e evitar o retorno à qualidade de vida vivida antes do tratamento (VARDY; TANNOCK, 2007). Foi sugerido um número de possíveis tratamentos que vão desde intervenções farmacológicas até terapias cognitivo-comportamentais. Atualmente, não há nenhum tratamento reconhecido como eficaz e uma melhor compreensão das causas do declínio cognitivo experimentado após a quimioterapia, sendo fundamental encontrar maneiras de prevenir ou tratar os efeitos do "chemobrain" (WIGMORE, 2013).

A doxorrubicina (DOX), um membro proeminente da família da antraciclina e um agente interativo da topoisomerase II, é comumente usada para tratar vários tipos de câncer humano e animal (SINHA; MASON, 2015). Embora a toxicidade da DOX em vários órgãos esteja bem estabelecida, seus efeitos sobre o cérebro são menos compreendidos e provavelmente mais complexos devido à incapacidade desse agente de penetrar no parênquima cerebral (ALUISE et al., 2010).

Grande parte da informação existente sobre os efeitos da DOX no SNC ainda é fragmentada e isso prejudica a aquisição de uma visão mais ampla do fenômeno chemobrain. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da droga sobre parâmetros comportamentais gerais, morfológicos e indicadores de estresse oxidativo do tecido nervoso, em ratos injetados com doses de doxorrubicina equivalentes às aquelas utilizadas nos tratamentos quimioterápicos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

## 2.1. Chemobrain

Sabe-se que as terapias contra o câncer estão associadas a uma toxicidade significativa do sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP), incluindo uma vasta gama de síndromes clínicas, tais como encefalopatias agudas, subagudas e crônicas, encefalopatia reversível posterior, disfunção aguda do cerebelo, comprometimento cognitivo, mielopatia, meningite, síndromes neurovasculares e neuropatias (DIETRICH et al., 2015; TAILLIBERT et al., 2016). A disfunção cognitiva é uma complicação cada vez mais reconhecida da quimioterapia (ASHER et al., 2015). O termo chemobrain, chemofog, ou ainda disfunção cognitiva induzida pela quimioterapia, foi criado aos pacientes com câncer que tiveram problemas com sua memória e / ou concentração durante e após o uso de protocolos quimioterápicos (VARDY; TANNOCK, 2007).

A neurotoxicidade relacionada à quimioterapia é dose-limitante e pode levar à descontinuidade do tratamento, assim impactando negativamente sobre a eficácia terapêutica do mesmo (TAILLIBERT et al. 2016). Os mecanismos subjacentes à disfunção cognitiva não são claros, mas várias vias têm sido propostas, incluindo a neurotoxicidade direta de agentes quimioterápicos, predisposição genética, estresse oxidativo, desregulação imune, citocinas pró-inflamatórias ou encurtamento dos telômeros (AHLES; SAYKIN, 2007; CHEUNG et al., 2013; WANG et al., 2015; GAMAN et al., 2016).

Em roedores, os agentes quimioterápicos demonstraram danificar células precursoras neurais e tratos da substância branca que estão associados a circuitos envolvidos no processo de aprendizagem e memória. Exames de imagem dos animais submetidos à quimioterapia revelaram reduções de volume da matéria cinzenta e branca e alterações ultraestruturais na substância branca do encéfalo (KAISER et al., 2014). Estudos morfológicos associados às alterações hemodinâmicas relacionadas à quimioterapia revelaram que a mesma altera os padrões de ativação das redes corticais envolvidas em funções cognitivas superiores. Tais achados sustentam a existência do fenômeno "chemobrain", além dos relatos subjetivos dos pacientes. No entanto, o pequeno número de estudos e as limitações metodológicas de algumas das investigações pioneiras exigem mais pesquisas de alta qualidade metodológica, incluindo um maior número de indivíduos com controles apropriados para delinear o padrão temporal e espacial do sistema nervoso central associado à toxicidade da quimioterapia neste sítio (SIMÓ et al., 2013).

## 2.2. Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclinas, isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetis* var. *caesius* (SUSANECK, 1983; JACOBS, 1996), relatado como de uso corrente em oncologia humana

e, em menor extensão, oncologia veterinária (SUSANECK, 1983). O antibiótico antraciclina doxorrubicina (DOX) é um fármaco quimioterapêutico muito potente e amplamente prescrito. As propriedades antineoplásicas da DOX incluem interferência na replicação de DNA e na síntese de RNA e a formação de radicais livres, que levam ao dano oxidativo das membranas celulares (IYVLEVA, IMYANITOV, 2016; OJHA et al., 2016). É muito utilizada na terapia de diversos tumores hematológicos e sólidos, embora sua administração seja comumente acompanhada de vários efeitos colaterais graves. O mais grave é o desenvolvimento de cardiotoxicidade dose-dependente e cumulativa. (FOJTU et al., 2017).

DOX é um agente protótipo de espécies reativas de oxigênio e, na presença de oxigênio molecular, gera o ânion radical superóxido reativo por meio de ciclo redox de sua porção quinona (KEENEY et al., 2015; SINHA; MASON, 2015). O dano oxidativo induz nos tecidos periféricos a elevação da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que cruza a BHE resultando em toxicidade do SNC, incluindo aumento adicional do TNF- $\alpha$  no cérebro, dano oxidativo e nitrosativo às principais biomoléculas (proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos), disfunção mitocondrial e morte neuronal (KEENEY et al., 2015).

Estudos recentes realizados *in vitro* apontam para o potencial neurotóxico da DOX, tendo sido capaz de realizar dano ao DNA e às sinapses e induzido a neuroinflamação em cultivos primários de neurônios (MANCHON et al., 2016).

### **2.3. Astrócitos**

Os astrócitos constituem as maiores e mais numerosas células gliais presentes no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos (BENVENISTE, 1992). Superam os neurônios em mais de cinco vezes e desempenham muitas funções críticas no sistema nervoso central saudável. Eles representam células dinâmicas que respondem a mudanças no microambiente neural por meio de alterações morfológicas e funcionais que afetam a atividade neuronal (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Os astrócitos caracterizam-se pela presença de prolongamentos dotados de filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP - glial fibrillary acidic protein), servindo como meio de identificação deste tipo celular em estudos *in situ* e em cultivo (MONTGOMERY, 1994).

Dentre as inúmeras funções desta célula, destacam-se a manutenção da homeostasia no microambiente neural, exercendo importante papel na detoxificação, na captação de neurotransmissores e na regulação do pH, da osmolaridade e concentração iônica do tecido nervoso. Os astrócitos relacionam-se ainda com a orientação da migração neuronal durante o desenvolvimento do SNC, o suporte mecânico para os oligodendrócitos durante a mielinização, o reparo após agressões no tecido nervoso, a produção e secreção de proteínas

da matriz extracelular, bem como com a síntese de moléculas de adesão, de fatores neurotróficos e promotores do crescimento de neuritos, a indução e manutenção das características de barreira hematoencefálica, a fagocitose de restos celulares e funções imunes, tais como secreção de citocinas (IL-1, IL-3, IL-6, IFN- $\alpha$  e  $\beta$ , TNF) e expressão de moléculas MHC de classe I e II (EDDLESTON; MUCKE, 1993; MONTGOMERY, 1994).

Independentemente da causa da lesão no SNC, o reparo do tecido é sempre realizado em maior ou menor grau com participação astrocitária. A reação dos astrócitos inclui o aumento de seu número (astrocitose) e de suas dimensões (astrogliose), além de várias outras alterações funcionais, como espessamento dos feixes de filamentos gliais e consequente aumento da intensidade de marcação de GFAP (EDDLESTON; MUCKE, 1993; MONTGOMERY, 1994).

Existe evidência cumulativa, tanto clínica quanto experimental, de que disfunções astrocitárias e astrogliose têm a capacidade de contribuir ou ser causa primária de muitas desordens do SNC, surgindo inclusive o estabelecimento da noção de astrocitopatias, originárias da perda das funções benéficas dessas células no microambiente neural e/ou da aquisição de seus efeitos deletérios no tecido nervoso (SOFRONIEW, 2015).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Delineamento Experimental**

Todos os passos deste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética em Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da Universidade Paulista – UNIP, que aprovou o protocolo do estudo (CE / UCS, protocolo nº 029/17). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

Quarenta ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos adultos, de 4 a 6 semanas de idade, foram divididos em dois grupos (n = 20 em cada): grupo DOX, constituído por ratos que receberam doxorubicina (FAULDOXO® 10 mg), por via intraperitoneal - IP, na dose semanal de 2,5 mg/kg durante 4 semanas; e grupo controle (CTR), de ratos injetados com o mesmo volume de solução salina estéril a 0,9% por via IP.

#### **3.2. Determinação da dose de DOX**

Este estudo utilizou a dose de 2,5 mg/kg, de acordo com os estudos realizados por Konat et al. (2008) e Ramalingayya et al. (2016).

#### **3.3. Testes Comportamentais**

Como procedimentos para o estudo comportamental foram adotados os testes de campo aberto, de labirinto em cruz elevado, de reconhecimento de objetos e de preferência social. O teste do campo aberto foi realizado semanalmente, para avaliação temporal da

atividade motora e exploratória dos animais durante todo o período experimental. Os demais testes comportamentais (labirinto em cruz elevada, preferência social e reconhecimento de novos objetos) foram realizados uma única vez durante a última semana de experimento. Todos os testes comportamentais foram analisados por dois observadores, sendo os resultados considerados como a média dos valores obtidos por ambos.

### **3.3.1. Teste de Campo Aberto**

O teste de campo aberto (TCA) foi realizado em um quarto de 1,8 x 4,6 m e iluminado por uma lâmpada de 15 lux. Cada rato foi individualmente colocado no centro do aparelho e os seguintes parâmetros foram posteriormente analisados: locomoção total, locomoção periférica e frequência de levantamento. O aparelho foi lavado com solução álcool/água 5% antes de colocar para os animais para obviar possíveis viés causado por sinais de odor deixados por ratos anteriores.

### **3.3.2. Teste de reconhecimento de novos objetos**

Para avaliação do reconhecimento de novo objeto, os animais, 24 horas após serem submetidos ao último teste de campo aberto, foram colocados novamente nesta arena por um período de 5 minutos, com a presença de três objetos de mesma cor, tamanho, forma e com peso relativamente alto para evitar que o rato movimente estes objetos.

Para a avaliação da memória de curto e longo prazo (VOGEL-CIERNIA, WOOD, 2014), os animais foram colocados novamente na arena, respectivamente, às 3 e 24 horas após fase de habituação, na presença de três objetos, um deles sendo novo para o animal (com cor, tamanho e forma diferentes dos outros dois objetos), de acordo com o descrito por MATHIESEN; DICAMILLO (2010) e SIK et al. (2014). A exploração do objeto, usada como parâmetro, será definida como direcionar o nariz para o objeto a uma distância de não mais de 2 cm e / ou tocar o objeto com o nariz ou boca.

### **3.3.3. Teste de Preferência Social**

O teste de preferência social foi realizado ao sexto dia após a última aplicação de DOX ou solução salina. A caixa de observação foi constituída de três partes: uma central e duas laterais. Na fase de habituação, os ratos puderam explorar as três câmaras livremente durante 10 minutos a partir do compartimento intermediário, com as outras duas câmaras contendo gaiolas de arame vazias. Na segunda fase, para testar a preferência social, o rato experimental foi imediatamente colocado no compartimento central, enquanto um rato desconhecido foi colocado numa das gaiolas de arame de forma aleatória, sendo que a outra gaiola ficava vazia. As portas foram reabertas e o rato pôde explorar as três câmaras durante 10 minutos. O tempo gasto em cada uma das câmaras, o número de entradas em cada

câmara e o tempo gasto em cheirar cada gaiola foram registrados como parâmetros para avaliar a preferência social (MOY et al., 2004, 2008).

### **3.3.4. Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

O LCE tem sido descrito como um método simples para avaliar as respostas de ansiedade de roedores (PELLOW et al., 1985; WALF; FRYE, 2007). Este teste foi realizado sete dias após a última aplicação de DOX ou de solução salina. A sala foi iluminada artificialmente por meio de lâmpadas fosforescentes (1200 lux), permanecendo o experimentador do lado de fora da sala de experimentação. O LCE ficou suspenso a uma altura de 50 cm do assoalho da sala por meio de um suporte de madeira. Para as observações comportamentais, o rato foi retirado de sua gaiola moradia e colocado no centro do LCE no início das sessões, sendo observado por 5 minutos. Os parâmetros analisados foram: número de entradas nos braços abertos, sendo considerada uma entrada quando o animal colocar as quatro patas dentro desse compartimento; número de entradas nos braços fechados, sendo considerada uma entrada seguindo o mesmo critério acima citado, porém agora no braço fechado; tempo de permanência nos braços abertos, em segundos; tempo de permanência nos braços fechados, em segundos e tempo no centro

### **3.4. Coleta de amostras e procedimentos de processamento**

Sete dias após a quarta aplicação de DOX ou de solução salina, os animais foram eutanasiados com solução de tiopental (60 mg/kg, via IP). Dez animais de cada grupo foram submetidos à perfusão intracardíaca com formol tamponado a 10%. Os encéfalos foram coletados, permanecendo por um período de 72 horas na referida solução fixadora e, após, foram realizados cortes coronais para obtenção das seguintes regiões encefálicas – córtex frontal/estriado, hipocampo, hipotálamo e ponte/cerebelo. Os outros dez animais de cada grupo tiveram seus encéfalos coletados e congelados a -80°C para posterior avaliação de citocinas e parâmetros do estresse oxidativo no tecido nervoso, assim como, tiveram seu sangue coletado (3 mL) por punção intracardíaca para a análise sérica de citocinas.

### **3.5. Estudo Morfológico do Tecido Nervoso**

A análise morfológica foi realizada por microscopia de luz a partir de cortes corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e luxol fast blue (para avaliação das bainhas de mielina), bem como por imuno-histoquímica para o marcador astrocitário GFAP.

### **3.6. Hematoxilina-eosina (H-E)**

Para a realização da técnica de H-E, as lâminas passaram por um processo de desparafinização composta de duas passagens em xilol, sendo a primeira na estufa, a 60°C por 30 minutos, e a segunda à temperatura ambiente por 5 minutos. O processo de hidratação



consistiu de passagens em concentrações decrescentes de álcoois, finalizando com água corrente por 1 minuto. Após a hidratação, as lâminas foram coradas com hematoxilina por 50 segundos e voltaram para água corrente para oxidação da hematoxilina por 2 a 4 minutos. A coloração pela eosina por 20 segundos foi precedida de uma passagem em álcool absoluto. Após o final da coloração, a desidratação foi realizada com 3 passagens com álcool absoluto. A clarificação foi realizada com uma passagem em xilol. Outra passagem em xilol preparou a lâmina para a montagem, com resina sintética (Entellan® Merck) e lamínula sobre o corte.

### **3.7. Luxol fast-blue**

Na técnica de luxol fast blue, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas até álcool 95% e, posteriormente, colocadas no corante luxol fast blue a 0,1% na estufa a 60°C, por 12 horas. Após essa etapa, as lâminas foram passadas em álcool 95% para retirada do excesso de corante e, assim, preparadas para a diferenciação que foi realizada com carbonato de lítio a 0,05% por 20 segundos e uma passagem em álcool 70%. A contracoloração foi realizada com cresil violeta por 8 minutos e, posteriormente, as lâminas foram desidratadas, clarificadas e montadas com resina sintética (Entellan® Merck).

### **3.8. Marcação Imuno-histoquímica para a GFAP**

A marcação imuno-histoquímica para a GFAP foi realizada utilizando o método conjugado a uma cadeia de polímeros (chain polymer-conjugated staining method) (DAKO EnVision System). Dez fotomicrografias de cada lâmina analisada foram feitas com o uso de objetiva de 40x. A área de astrócitos e seus processos marcados em marrom, foi calculada automaticamente, utilizando o index per area do software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA) calibrado com filtros de cores digitais. O index astrocitário per area representa a proporção da área marcada em relação à área total da imagem, sendo 0 a completa ausência de marcação e, 1, a marcação total da área.

### **3.9. Preparação do Homogenato Encefálico**

O procedimento para obtenção do homogenato encefálico foi adaptado do protocolo descrito por Yen et al. (1999).

### **3.10. Determinação dos Níveis Encefálicos de TBARS**

A concentração no encéfalo de marcadores da peroxidação lipídica foi determinada por meio da medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando protocolo descrito por Jentzsch et al. (1995) modificado.

### **3.11. Determinação dos Níveis Encefálicos de CAT**

Os ensaios da atividade da CAT foram realizados segundo o método descrito por Aebi (1984). Os resultados foram expressos em unidades de CAT por miligrama de proteína (CAT U/mg prot).

### **3.12. Determinação dos Níveis Encefálicos de SOD**

Os ensaios da atividade da SOD foram realizados segundo o método descrito por Ewing & Janero (1995).

### **3.13. Determinação dos Níveis Encefálicos de GPx e GR**

As atividades enzimáticas de glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) foram determinadas, de acordo com Wendel (1981).

### **3.14. Determinação dos Níveis Encefálicos de Glutathione Reduzida (GSH) e Oxidada (GSSG)**

As concentrações encefálicas de GSH foram determinadas de acordo com Rahman et al. (2007) adaptado.

### **3.15. Determinação dos Níveis Encefálicos de NO**

Alíquotas de 50 µL da amostra foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços (fundo plano) e, em seguida, um igual volume de reagente de Griess (0,1 g N-1-naftil-etilenediamina, 1 g sulfanilamida, 2,5 mL de ácido ortofosfórico e 90 mL de água bidestilada) foi adicionado a estes poços. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada em 550 nm em leitor de microplacas para espectrofotometria. As concentrações encefálicas de NO foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, e os valores expressos em micromoles (µmols) de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>).

### **3.16. Determinação dos Níveis Encefálicos de Ferro e Ferritina**

A quantidade de ferro (Fe) no encéfalo foi determinada pelo método de Goodwin & Murphy (1966) modificado, utilizando-se kit Ferro Sérico - K017 (Bioclin, Minas Gerais, Brasil).

A concentração de ferritina no encéfalo foi determinada por turbidimetria utilizando kit Turbilatex Ferritin (Spinreact, Sant Esteve de Pas, Espanha), seguindo as recomendações fornecidas pelo fabricante. Os resultados são expressos em nanogramas de ferritina por mililitro (ng/mL).

### **3.17. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)**

Os níveis séricos e encefálicos de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 e CXCL1 foram determinados em duplicata por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções dos fabricantes: kit de ELISA IL-1 $\beta$  Platinum de rato (eBioscience, BMS630, San

Diego, Califórnia, EUA); kit de ELISA TNF- $\alpha$  Platinum de rato (eBioscience, BMS622, San Diego, Califórnia, EUA); kit de ELISA IL-6 de rato (Invitrogen, BMS625, Carlsbad, Califórnia, EUA); kit de ELISA IL-8 de rato (MyBioSource, MBS025179, San Diego, Califórnia, EUA); kit de ELISA IL-10 de rato, BMS629, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA); e kit de ELISA CXCL1 de rato (R&D Systems, RCN100, Minneapolis, Minnesota, EUA).

### 3.18. Análise Estatística

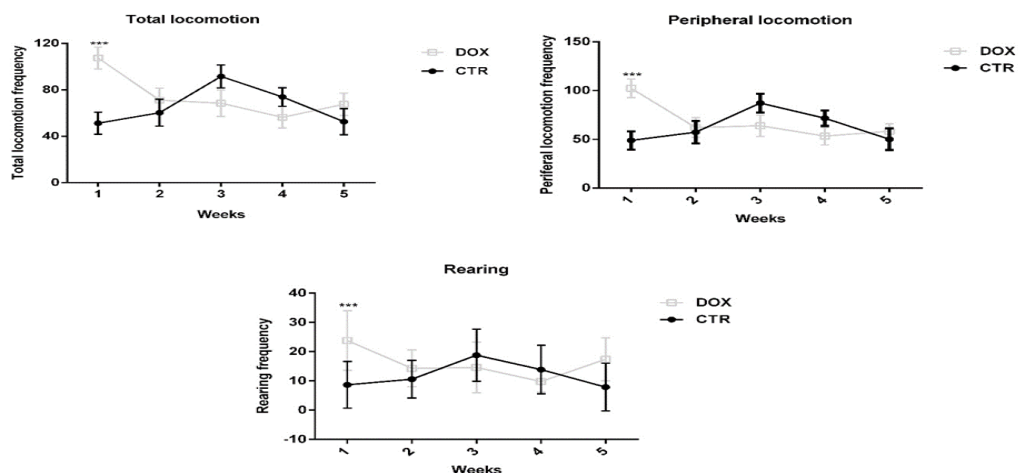
A homoscedasticidade foi verificada usando um F-teste, ou de Bartlett e, a normalidade, com o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste t de Student (não pareado, bicaudal) e o teste de Mann-Whitney foram usados para comparar dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente, entre grupos. A análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Bonferroni, foi utilizada para analisar dados com dois fatores (campo aberto). ANOVA de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, foi empregada para análise dos resultados dos testes de preferência social e de reconhecimento de novos objetos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos se  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1. Testes Comportamentais

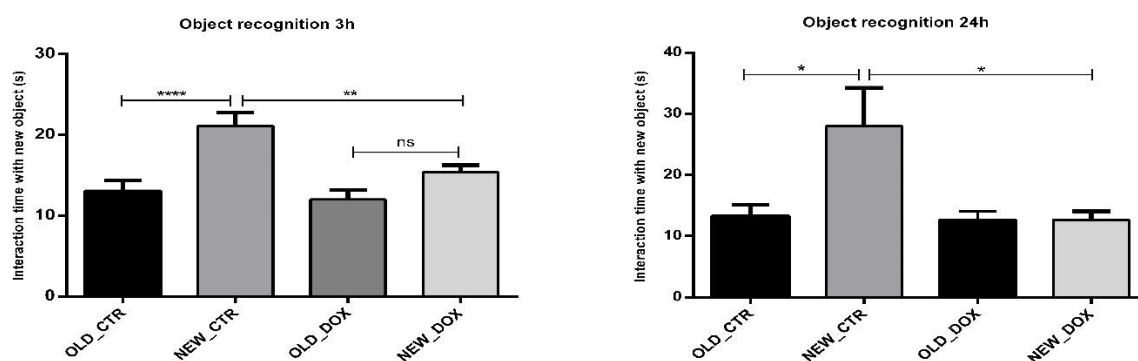
Alterações significativas referentes às frequências de locomoção e de levantar ( $p < 0,001$ ) dos animais do grupo DOX foram vistas na primeira semana de tratamento, porém tal fenômeno não mais se repetiu no decorrer do experimento, não tendo sido observadas alterações estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros avaliados nas semanas 2, 3, 4 e 5 (Fig. 1).

Figura 1 – Frequência de locomoção total (total locomotion) e periférica (peripheral locomotion) e de levantar (rearing) no teste do campo aberto nas semanas (weeks) 1, 2, 3, 4 e 5 de experimento. Grupo controle (CTR) e grupo doxorrubicina (DOX). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni).



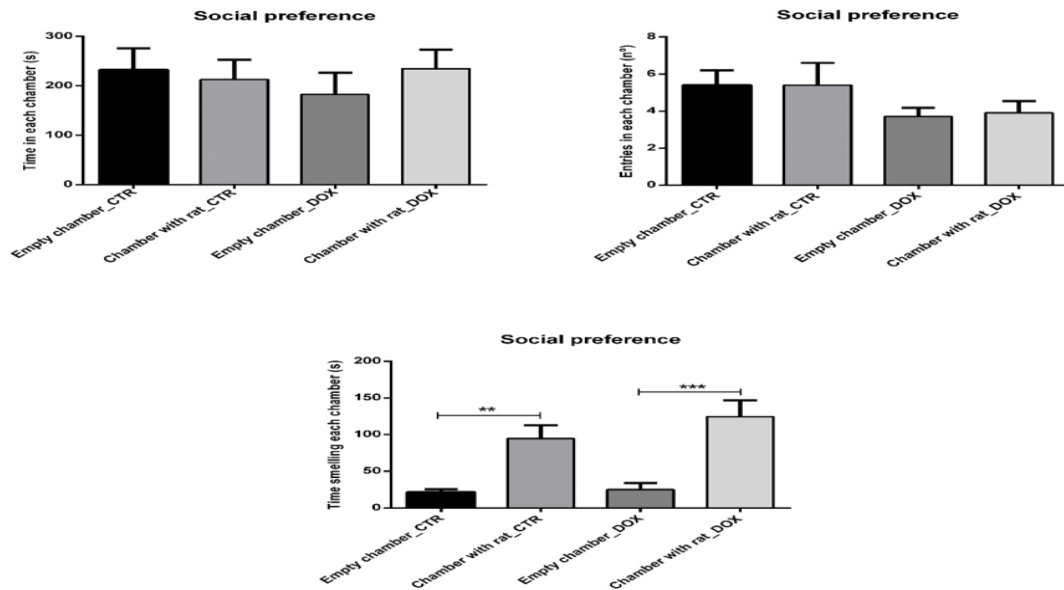
No teste de reconhecimento de novo objeto após 3 horas, notou-se que os animais pertencentes ao grupo DOX demonstraram um menor tempo de interação com o novo objeto quando comparados aos animais do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Fenômeno semelhante também foi visto no mesmo teste após 24 horas. Percebe-se, ainda no grupo DOX, que os animais não apresentaram diferença no tempo de interação com o novo e com o objeto antigo, diferentemente do que foi visto nos animais do grupo controle após 3 ( $p < 0,0001$ ) e 24 horas ( $p < 0,05$ ) da habituação (Fig. 2). Apontando que os ratos tratados com doxorubicina, não reconheceram o objeto antigo com a mesma facilidade comparada ao grupo controle.

Figura 2 – Teste de reconhecimento de novo objeto. Tempo de interação em segundos (s) com um objeto novo ou previamente explorado depois de 3h (Object recognition 3h) ou 24h (Object recognition 24h) do período de habituação. Old – objeto antigo; New – objeto novo. Grupo controle (CTR) e grupo doxorubicina (DOX). \*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey).



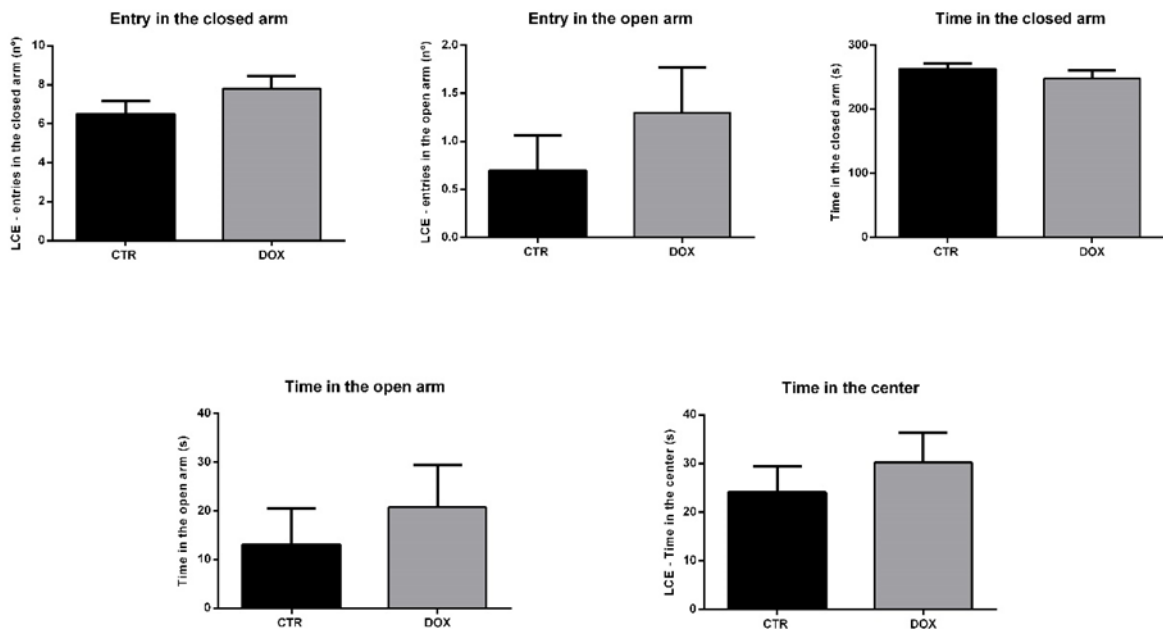
As alterações estatisticamente significativas apresentadas no teste de preferência social ( $p < 0,01$ ) correspondem ao maior tempo que os animais, de ambos os grupos, dispenderam cheirando a gaiola com o rato desconhecido (Fig. 3).

Figura 3 – Teste de preferência social. Tempo gasto em segundos (s) pelos animais em cada câmara (time in each chamber), número de entradas em cada câmara (entries in each chamber) e tempo gasto em segundos (s) cheirando cada câmara (time smelling each chamber). Empty chamber - câmara vazia; Chamber with rat - câmara com rato. Grupo controle (CTR) e grupo doxorubicina (DOX). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey).



No teste do labirinto em cruz elevada não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Fig. 4).

Figura 4 – Comportamento no labirinto em cruz elevada. Número de entradas no braço fechado (entry in the closed arm) e aberto (entry in the open arm), tempo de permanência em segundos (s) no braço fechado (time in the closed arm), no braço aberto (time in the open arm) e no centro (time in the center). Grupo controle (CTR) e grupo doxorrubicina (DOX).  $p > 0,05$  (teste t de Student, não-pareado, bicaudal).



#### 4.2. Perfil Redox e Avaliação de Citocinas

Os animais pertencentes ao grupo DOX apresentaram um aumento significativo na produção de TBARS ( $p < 0,05$ ) e no NO ( $p < 0,01$ ), bem como nos níveis GR ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo CTR. Por sua vez, os animais do grupo DOX tiveram uma diminuição

nos níveis de GSSG e de ferritina ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de CAT, SOD, GPx, GSH e ferro (Fig. 5).

Com relação à produção de citocinas pelo tecido nervoso, no grupo DOX foi visto um aumento significativo nos níveis de IL-6 ( $p < 0,0001$ ), de IL-8 ( $p < 0,01$ ) e de CXCL1 ( $p < 0,001$ ), observando-se, porém, uma diminuição na produção de IL-10 ( $p < 0,01$ ). Não foram encontradas diferenças significativas para os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  entre os dois grupos analisados (Fig. 6).

Por sua vez, as amostras de soro dos animais pertencentes ao grupo DOX demonstraram uma maior produção de CXCL1 ( $p < 0,001$ ) e de IL-6 ( $p < 0,01$ ), com simultânea diminuição de IL-10 ( $p < 0,05$ ). Por fim, não foram vistas alterações estatisticamente significativas nos níveis séricos de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 (Fig. 7).

Figura 5 – Perfil redox de ratos injetados com doxorubicina (grupo DOX, 2,5 mg/kg/semana, por 4 semanas, via IP) e solução salina a 0,9% (grupo controle - CTR). Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona reduzida (GSH), glutaciona oxidada (GSSG), óxido nítrico (NO), ferro (Fe) e ferritina (ferritin). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (teste t de Student, não-pareado, bicaudal).

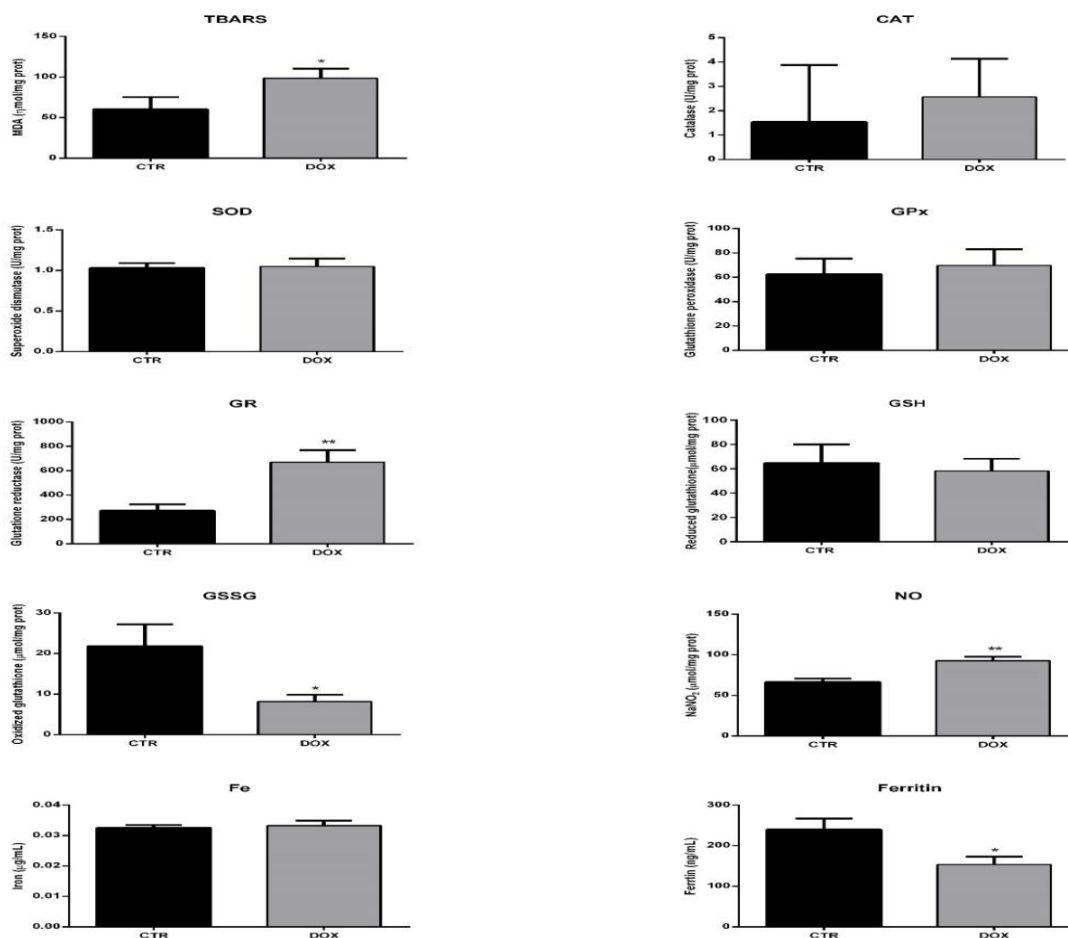


Figura 6 – Níveis encefálicos das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 e CXCL1 (em pg/mg de proteína total) de ratos tratados com doxorubicina (grupo DOX, 2,5 mg/kg/semana, por 4 semanas, via IP) ou solução salina a 0,9% (grupo controle - CTR). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. \*\* p < 0,001. \*\*\*\* p < 0,0001 (teste t de Student, não-pareado, bicaudal).

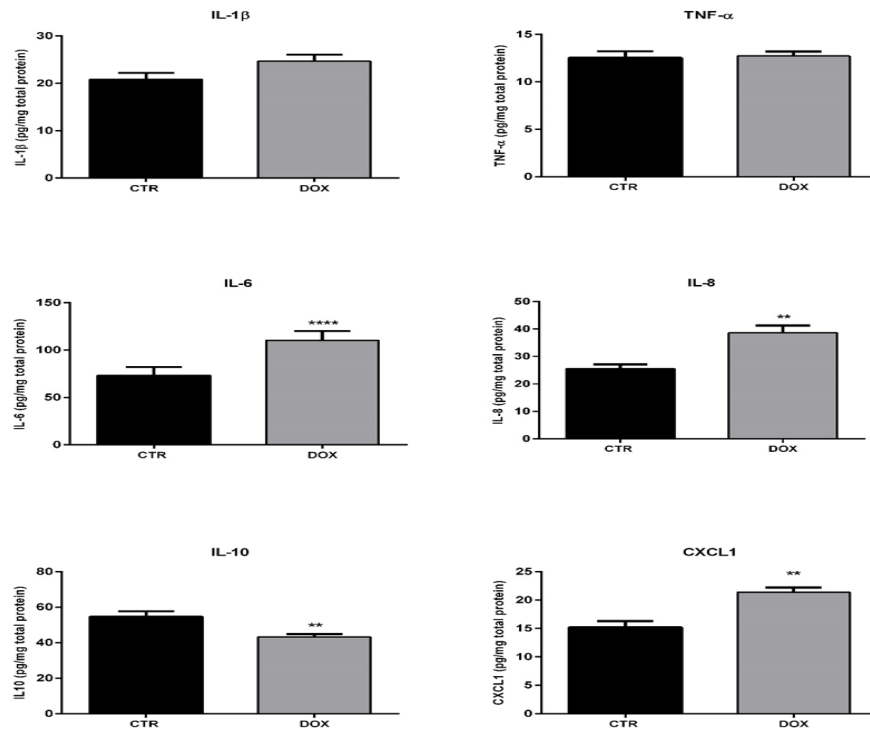
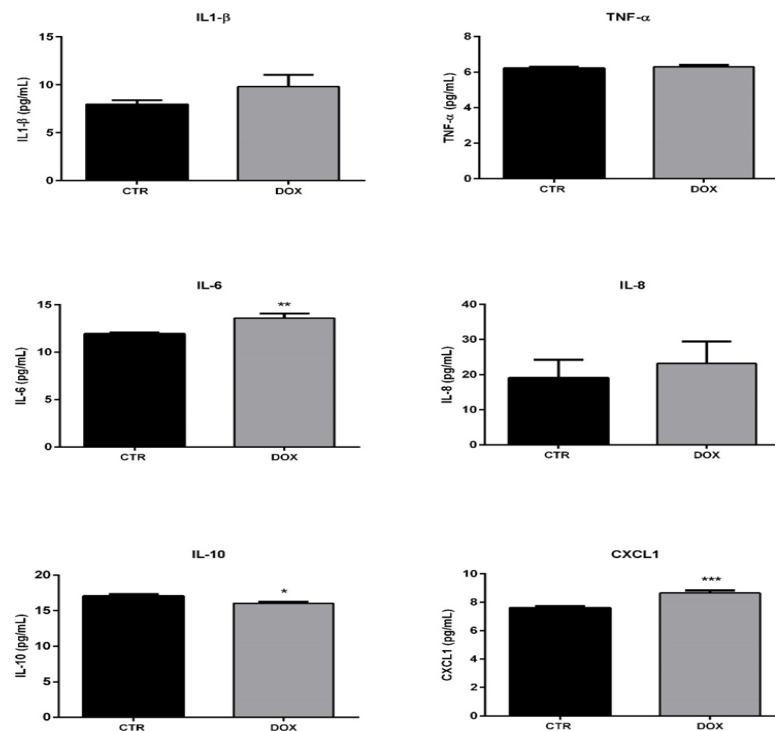


Figura 7 - Níveis séricos das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 e CXCL1 (em pg/mL) de ratos tratados com doxorubicina (grupo DOX, 2,5 mg/kg/semana, por 4 semanas, via IP) ou solução salina a 0,9% (grupo controle - CTR). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. \* p < 0,05. \*\* p < 0,001. \*\*\* p < 0,0005 (teste t de Student, não-pareado, bicaudal).



#### 4.3. Expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP)

Os animais pertencentes ao grupo DOX apresentaram um aumento significativo na expressão de GFAP em todas as áreas analisadas (córtex frontal, estriado, hipocampo, hipotálamo, camadas granular e molecular do cerebelo) quando comparados ao grupo CTR ( $p < 0,0001$ ) (Fig.8). O aumento na expressão do marcador GFAP, indica maior participação astrocitária nas áreas.

A Figura 9 ilustra as fotomicrografias (em objetiva de 40x) da marcação imunohistoquímica para a GFAP nos grupos CTR e DOX. Sendo que há maior intensidade na marcação de GFAP em todas as áreas analisadas do grupo DOX. Pelas fotomicrografias, é possível identificar aumento nas dimensões dos astrócitos, ou seja, ocorrência de astrogliose. Essa manifestação astrocitária é indício de lesão no SNC.

Figura 8 - Expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em ratos tratados com doxorubicina (grupo DOX, 2,5 mg/kg/semana, por 4 semanas, via IP) ou solução salina a 0,9% (grupo controle - CTR) no córtex frontal, estriado, hipocampo, hipotálamo, camadas granular e molecular do cerebelo. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (teste U de Mann-Whitney). O index astrocitário per area representa a proporção da área marcada em relação à área total da imagem, sendo 0 a completa ausência de marcação e, 1, a marcação total da área.

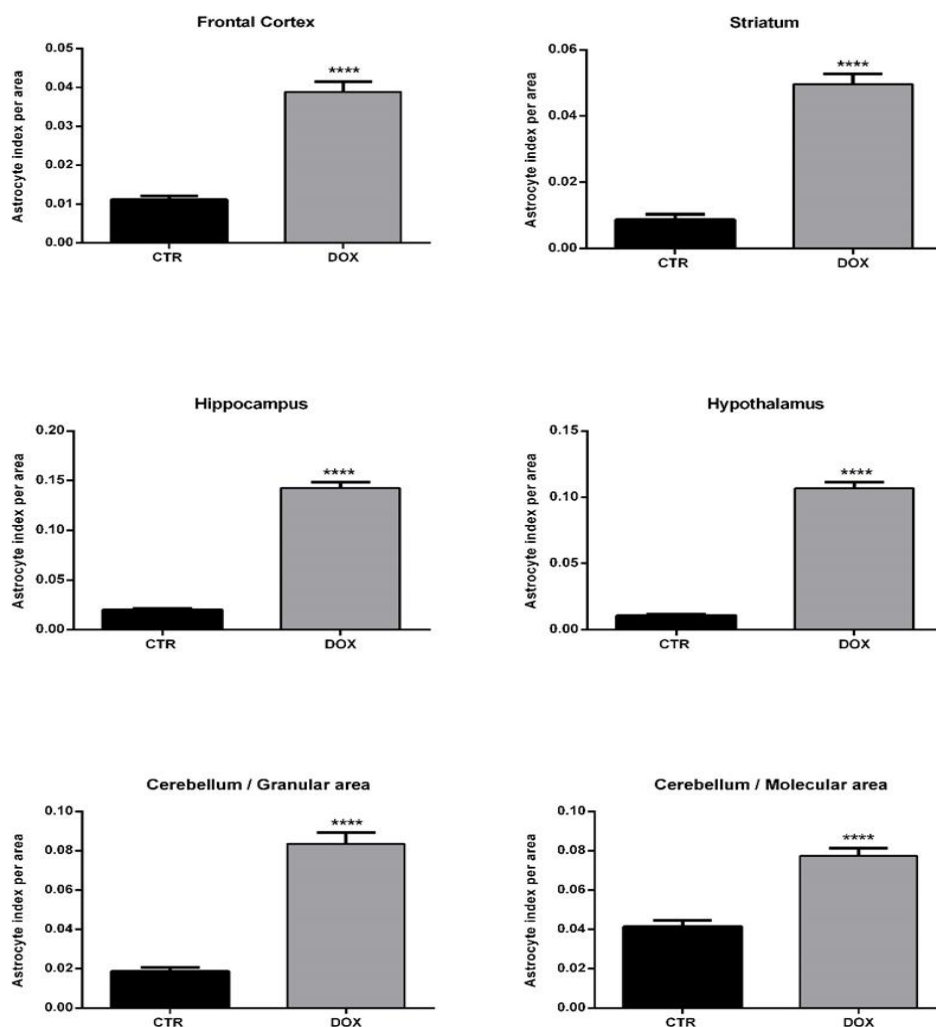
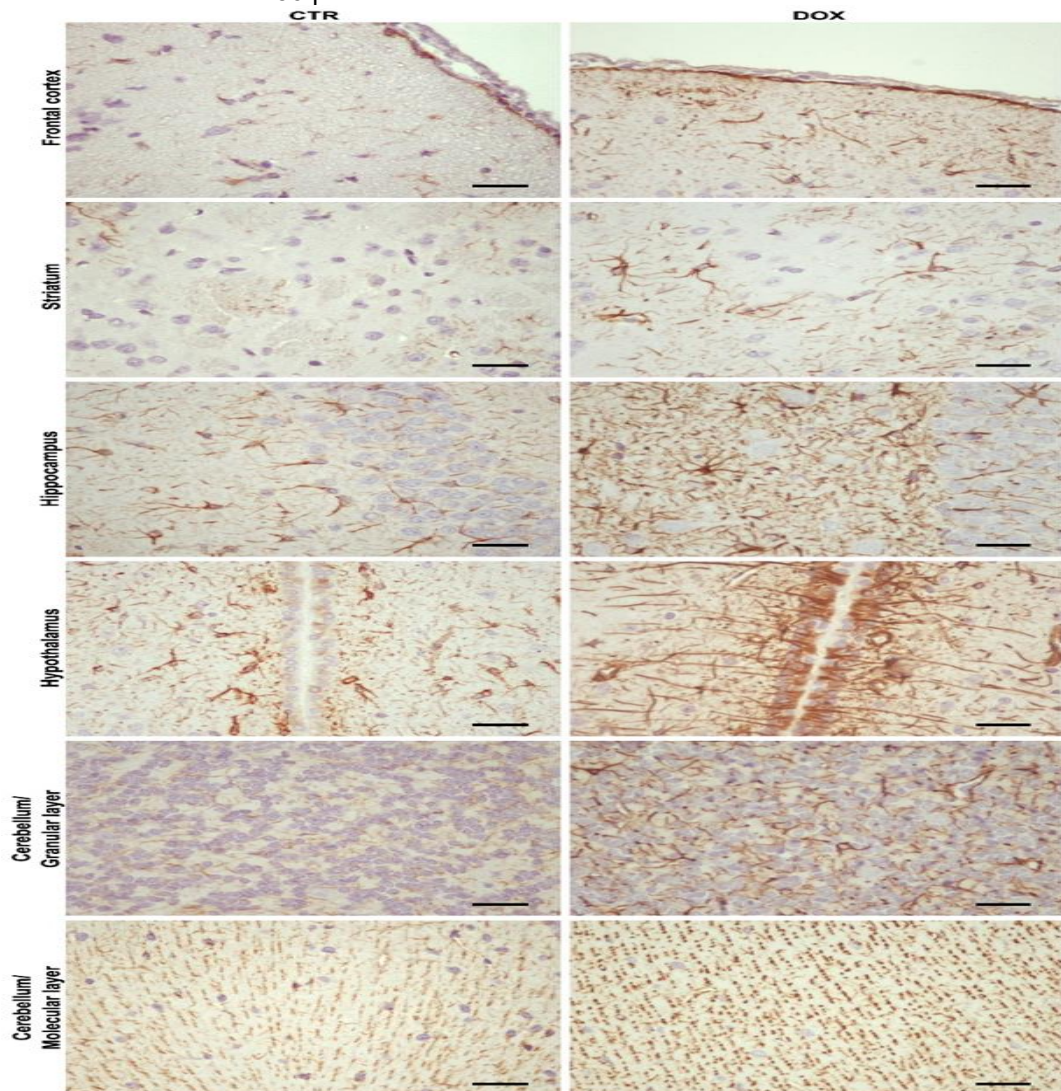




Figura 9 - Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica para a GFAP em ratos tratados com doxorrubicina (grupo DOX, 2,5 mg/kg/semana, por 4 semanas, via IP) ou solução salina a 0,9% (grupo CTR) no córtex frontal, estriado, hipocampo, hipotálamo, camadas granular e molecular do cerebelo. Barra de escala = 50  $\mu$ m.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidências de significativas alterações no sistema nervoso central após uso do quimioterápico doxorrubicina foram confirmadas pelo teste de reconhecimento de objetos, demonstrando que houve comprometimento da memória de curto e longo prazo. E pela análise dos demais parâmetros, os quais demonstraram que o tratamento com doxorrubicina nos ratos induziu a astrogliose e significativo estresse oxidativo (neuroinflamação) no encéfalo. O presente estudo contribui como subsídio científico para conhecimento e compreensão do fenômeno chemobrain, sendo que, para que seja possível investigar formas de tratamento ou prevenção, o entendimento do mesmo é fundamental.

## 6. REFERÊNCIAS

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

ALUISE, C.D., SULTANA, R., TANGPONG, J., VORE, M., ST CLAIR, D., MOSCOW, J.A., BUTTERFIELD, D.A. Chemobrain (chemofog) as a potential side effect of doxorubicin administration: role of cytokine-induced, oxidative/nitrosative stress in cognitive dysfunction. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 678, p.147-156, 2010.

ASHER, A., MYERS, J.S. The effect of cancer treatment on cognitive function. **Clin. Adv. Hematol. Oncol.**, v. 13, p. 441-450, 2015.

BENVENISTE, E.N. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. In: BLALOCK, J.E. **Neuroimmunoendocrinology**. 2. ed. Basel: Karger, p. 106-153, 1992.

CHEUNG, T.Y., LIM, R.S., HO, K.H., CHAN, A. Cytokines as mediators of chemotherapy-associated cognitive changes: Current evidence, limitations and directions for future research. *Plos One*, v. 8, p. 1-12, 2013.

DIETRICH, J., PRUST, M., KAISER, J. Chemotherapy, cognitive impairment and hippocampal toxicity. *Neuroscience*, v. 309, p. 224-232, 2015.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, v. 54, p. 15-36, 1993.

ESPINOSA, I.; NIETO-SAMPEDRO, M.; BOVOLENTA, P. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. **Glia**, v. 8, p. 277-291, 1993.

EWING, J. F.; JANERO, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Analytical Biochemistry**, v. 232, p. 232-243, 1995.

FOJTU, M.; GUMULEC, J.; RAUDENSKA, M.; SKATAKOVA, A.; VACULOVICOVA, M.; ADAM, V.; BABULA, P.; NOVAKOVA, M.; MASARIK, M. Reduction of doxorubicin-induced cardiotoxicity using nanocarriers: A review. **Current Drug Metabolism**, v. 18, p. 12, 2017.

GAMAN, M.A., UZONI, A., POPA-WAGNER, A., ANDREI, A., PETCU, B.E. The role of oxidative stress in etiopathogenesis of chemotherapy induced cognitive impairment (CICI) - "chemobrain". *Aging Dis*, v. 7, p. 302-312, 2016

GOODWIN, J. F.; MURPHY, B. The colorimetric determination of iron in biological material with reference to its measurement during chelation therapy. **Clinical Chemistry**, v. 12, p. 58-69, 1966.

HALLE C.F.; MOORE, M.D. An overview of chemotherapy-related cognitive dysfunction, or "chemobrain". *Oncology Journal*, v. 9, p. 797-804, 2014.

IYEVLEVA, A.G.; IMYANITOV, E.N. Cytotoxic and targeted therapy for hereditary cancers. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**, v. 1, p. 14-17, 2016.

JACOBS, G.J. Secondary canine cardiomyopathies: their causes and characteristics. **Vet. Med.**, v.91, p.534-542, 1996.

JENTZSCH, A. M.; BACHMANN H.; BIESALSKI H. K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 251-256, 1995.

KAISER, J.; BLEADOWSKI, C.; DIETRICH, J. Neural correlates of chemotherapy-related cognitive impairment. *Cortex*, v. 54, p. 33-50, 2014.

KEENEY, J.T., MIRIYALA, S., NOEL, T., MOSCOW, J.A., ST. CLAIR, D.K., BUTTERFIELD, D.A. Superoxide induces protein oxidation in plasma and TNF-alpha elevation in macrophage culture: Insights into mechanisms of neurotoxicity following doxorubicin chemotherapy. **Cancer Lett**, v. 367, p. 157-161, 2015.

KONAT, G. W.; KRASZPULSKI, M.; JAMES, I.; ZHANG, T. H.; ABRAHAM, J. Cognitive dysfunction induced by chronic administration of common cancer chemotherapeutics in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 23, p. 325-333, 2008.

MATHIESEN, J. R.; DiCAMILLO, A. Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 49, p. 1-15, 2010.

MOY, S. S.; NADLER, J. J.; PEREZ, A.; BARBARO, R. P.; JOHNS, J. M.; MAGNUSON, T. R.; PIVEN, J.; CRAWLEY, J. N. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to asses autistic-like behavior in mice. **Genes, Brains and Behavior**, v. 5, p. 287-302, 2004.

MOY, S. S.; NADLER, J. J.; YOUNG, N. B.; NONNEMAN, R. J.; SEGALL, S. K.; ANDRADE, G. M.; CRAWLEY, J. N.; MAGNUSON, T. R. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. **Behavioural Brain Research**, v. 1, p. 118-129, 2008.

OJHA, S.; AL TAE, H.; GOYAL, S.; MAHAJAN, U.B.; PATIL, C.R.; ARYA, D.S.; RAJESH, M. Cardioprotective potentials of plant-derived small molecules against doxorubicin associated cardiotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 23, p. 1-19, 2016.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 3, p. 149-167, 1985.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 1, p. 3159-3165, 2007.

RAMALINGAYYA, G. V.; NAYAK, P. G.; SHENOY, R. R.; RAO, C. M.; NANDAKUMAR, K. Female rats induced with mammary cancer as a relevant animal model for doxorubicin-induced chemobrain in vivo. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, p. 862-863, 2016.

SIK, A.; VAN, N. P.; PRICKAERTS, J.; BLOKLAND, A. Performance of different mouse strains in an object recognition task. **Behavioural Brain Research**, v. 147, p. 49-54, 2003.

SIMÓ, M.; RIFÀ-ROS, X.; FORNELLS, R.A.; BRUNA, J. Chemobrain: A systematic review of structural and functional neuroimaging studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, p. 1311-1321, 2013.

SINHA, B.K., MASON, R.P. Is metabolic activation of topoisomerase II poisons important in the mechanism of cytotoxicity? *J. Drug Metab. Toxicol*, v. 6, p. 1-8, 2015.

SOFRONIEW, M.V., VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, p. 7-35, 2010.

SOFRONIEW, M.V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, p. 249-263, 2015.

SUSANECK, S.J. Doxorubicin therapy in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.182, p.70-72, 1983.

TAILLIBERT, S.; RHUN, E.L.; CHAMBERLAIN, M.C. Chemotherapy-related neurotoxicity. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 16, p. 3-14, 2016.

VARDI, J.; TANNOCK, I. Cognitive function after chemotherapy in adults with solid tumours. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 63, p. 183-202, 2007.

VOGEL-CIERNIA, A.; WOOD, A. M. Examining object location and object recognition memory in mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 69, p. 1-17, 2014.

WALF, A. A.; FRYE, A. C. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, p. 322-328, 2007.

WANG, X.M.; WALITT, B.; SALIGAN, L.; TIWARI, A.F.; CHEUNG, C.W. Chemobrain: A critical review and causal hypothesis of link between cytokines and epigenetic reprogramming associated with chemotherapy. **Cytokine**, v. 72, p. 86-96, 2015.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WIGMORE, P. The effect of systemic chemotherapy on neurogenesis, plasticity and memory. **Current Topics in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 211-240, 2013.

YEN, H. C.; OBERLEY, T. D.; GAIROLA, C. G.; SZWEDA, L. I.; CLAIR, D. K. Manganese superoxide dismutase protects mitochondrial complex I against adriamycin-induced cardiomyopathy in transgenic mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 66, p. 359-362, 1999.

Contatos: [Isa.bolognese@hotmail.com](mailto:Isa.bolognese@hotmail.com); [eder.pincinato@mackenzie.br](mailto:eder.pincinato@mackenzie.br)