

**TÍTULO:** CHEMOBRAIN □ ESTUDO MORFOLÓGICO E DA RESPOSTA OXIDATIVA E INFLAMATÓRIA INDUZIDA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELO QUIMIOTERÁPICO DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** Medicina Veterinária

**INSTITUIÇÃO:** UNIVERSIDADE CRUZEIRO DO SUL - UNICSUL

**AUTOR(ES):** LEONARDO DE ANDRADE PRÍNCIPE

**ORIENTADOR(ES):** EDUARDO FERNANDES BONDAN

***UNIVERSIDADE CRUZEIRO DO SUL***

**PROJETO DE PESQUISA**

***CHEMOBRAIN – ESTUDO MORFOLÓGICO E DA RESPOSTA OXIDATIVA E  
INFLAMATÓRIA INDUZIDA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL PELO  
QUIMIOTERÁPICO DOXORRUBICINA EM CAMUNDONGOS***

Aluno: Leonardo de Andrade Príncipe

Orientação: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan

## **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 a doxorubicina exerce alguns efeitos neurotóxicos colaterais, induzindo prejuízo cognitivo e promovendo alterações estruturais no encéfalo, permanecem ainda obscuros. O presente estudo visa a investigar, em camundongos injetados com doses de doxorubicina equivalentes àquelas utilizadas nos tratamentos quimioterápicos, os efeitos morfológicos da droga sobre distintas áreas encefálicas, como córtex frontal, estriado, hipocampo, hipotálamo e camadas granular e molecular do cerebelo, mediante observação de lâminas histológicas do tecido nervoso coradas com hematoxilina-eosina (H-E) e luxol fast blue, assim como marcadas por imuno-histoquímica para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), principal marcador da população astrocitária. Serão ainda avaliados parâmetros indicadores de estresse oxidativo do tecido nervoso, tais como TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico), NO (óxido nítrico), SOD (superóxido dismutase), catalase, GR (glutaciona redutase) e GPx (glutaciona peroxidase), assim como o perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias presentes (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ).

## **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). Tais alterações, embora sutis, podem causar angústia significativa entre os pacientes e evitar o retorno à qualidade de vida vivida antes do tratamento. 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).

Os déficits cognitivos experimentados por pacientes tratados com diferentes quimioterápicos podem durar até vários anos e ter um efeito deletério sobre a escolaridade e a capacidade de retornar ao trabalho. Estudos de imagem de pacientes após quimioterapia sistêmica mostram que este tratamento produz alterações estruturais e funcionais no encéfalo, algumas das quais parecem persistir mesmo quando os déficits cognitivos cessaram. Isto sugere que, com o tempo, a plasticidade neural pode ser capaz de compensar os efeitos deletérios do tratamento quimioterápico (HURRIA et al., 2007; BOYKOFF et al., 2009).

Vários mecanismos foram sugeridos para as alterações estruturais e funcionais no encéfalo após a quimioterapia. Estes incluem alterações inflamatórias centrais e periféricas, desmielinização de tratos da substância branca, redução na proliferação de células estaminais na região neurogênica do hipocampo e de células precursoras de oligodendrócitos (OPCs), assim como modificações nos níveis hormonais e/ou de fatores de crescimento (PIERRE, McDONALD, 2016). Foi sugerido um número de possíveis tratamentos que vão desde intervenções farmacológicas até terapias cognitivo-comportamentais. Alguns destes tratamentos foram testados apenas em modelos animais, enquanto outros têm produzido vários graus de melhora nas populações de pacientes. 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).

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).

Estudos com animais levantaram a hipótese de que a administração de agentes quimioterápicos inicia uma cascata de alterações biológicas, com alterações de curta duração no ambiente das citocinas, induzindo alterações epigenéticas persistentes. Tais mudanças epigenéticas levam a alterações na expressão gênica, alterações na atividade metabólica e na transmissão neuronal, que são responsáveis pela geração da experiência subjetiva da cognição (WANG et al., 2015).

Um estudo recente envolvendo o estresse oxidativo no encéfalo de indivíduos com doença de Alzheimer e seus modelos animais, bem como usando o encéfalo de animais que tiveram comprometimento cognitivo induzido por DOX, aponta a capacidade deste agente quimioterápico de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), elevando os níveis periféricos de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória que atravessa a BHE e é capaz de induzir o estresse oxidativo no parênquima nervoso, afetando negativamente as mitocôndrias e conseqüentemente conduzindo à morte celular apoptótica, o que levaria ao comprometimento cognitivo (BUTHERFIELD, 2014).

Os astrócitos constituem as maiores e mais numerosas células gliais presentes no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos, excedendo o número de neurônios na proporção de 10:1 (BENVENISTE, 1992). Apesar de sua pronunciada heterogeneidade morfológica e bioquímica, 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 (PETERS et al., 1991; 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). Estes fenômenos têm sido referidos como gliose astrocitária, astrocitose e astrogliose reativas, cicatriz glial ou simplesmente gliose, podendo ser de 2 tipos de acordo com o tipo de dano provocado - isomórfica, onde os processos astrocitários apresentam-se orientados pelos elementos teciduais preservados e o arranjo dos feixes de filamentos gliais é uniforme e paralelo, e anisomórfica, onde sua disposição é irregular ao redor de lesão geralmente causadora de dano morfológico grosseiro na estrutura do tecido, com ruptura da barreira hematoencefálica (FERNAUD-ESPINOSA et al., 1993; BIGNAMI; DAHL, 1994).

É reconhecido que mesmo mudanças sutis na expressão molecular dos astrócitos, à medida que ficam mais ou menos reativos, demonstram o potencial dos mesmos de exercer efeitos pronunciados nas células neurais circundantes (SOFRONIEW, 2009). 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).

O antibiótico antraciclina doxorubicina (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. Ao longo do tempo, muitas estratégias têm sido investigadas para evitar ou pelo menos diminuir a disfunção cardíaca induzida pela DOX. Contudo, a atenuação do seu efeito cardiotóxico ainda não é satisfatória (FOJTU et al., 2017).

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). Em outro estudo também recente, utilizando o modelo experimental de ratos tratados com DOX, foi descrita a capacidade do quimioterápico em induzir a autofagia lisossomal nos neurônios dos animais que receberam a droga, ainda aumentando a formação de vacúolos intracitoplasmáticos, o aparecimento de organelas danificadas, de complexos autofagosomos e de gotículas lipídicas. Importante ressaltar que foi observado, além do prejuízo à via autofágica-lisossômica, que os animais tratados com DOX também apresentaram acúmulo de lipofuscina, concluindo-se que a DOX também apresenta potencial de envelhecimento tecidual, uma vez que tal composto é comumente observado em animais senis (MANCHON et al., 2016).

Uma análise utilizando ratos inoculados com glioblastoma e tratados com DOX apresentou uma maior expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) nos animais tratados quando comparados aos animais do grupo controle. Embora a GFAP seja mais expressada nos tumores gliais, o estudo aponta uma expressão significativamente maior, chegando a expressar 50% mais nos animais tratados com DOX (WOHLFART et al., 2011).

## **OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo será o de:

- investigar possíveis alterações morfológicas do tecido nervoso em diferentes áreas encefálicas (córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e camadas granular e molecular do cerebelo) mediante análise de cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina e luxol fast blue, assim como marcados por imuno-histoquímica para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), principal marcador da população astrocitária.

- quantificar distintos parâmetros indicativos de estresse oxidativo induzido pelo quimioterápico sobre o tecido nervoso (TBARS- substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, NO- óxido nítrico, SOD- superóxido dismutase, catalase, GR- glutathione reductase e GPx- glutathione peroxidase), bem como citocinas da possível resposta inflamatória desencadeada (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ).

## **JUSTIFICATIVA**

Os estudos em animais oferecem a possibilidade de avaliar o comprometimento cognitivo induzido pela quimioterapia, evitando inúmeros fatores potencialmente confundidores que afetam a pesquisa em humanos.

Atualmente, não há nenhum tratamento reconhecido para os efeitos colaterais neurotóxicos de alguns agentes quimioterápicos. Dessa forma, uma melhor compreensão das causas do declínio cognitivo experimentado após a quimioterapia se faz fundamental, buscando-se maneiras de prevenir ou tratar os efeitos do “chemobrain”.

O estudo dos efeitos deletérios à cognição de pacientes tratados com quimioterápicos tem sido amplamente pesquisado em diversos países, porém ainda restam muitas lacunas a serem preenchidas sobre os mecanismos de ação das drogas utilizadas e seus possíveis efeitos deletérios sobre as células constituintes do tecido nervoso. Cabe à pesquisa básica e, neste caso, inédita no Brasil, aprofundar os conhecimentos a fim de colaborar para o desenvolvimento de intervenções cognitivo-comportamentais e farmacológicas que permitam reduzir os efeitos colaterais cognitivos dos tratamentos quimioterápicos indispensáveis, porém sabidamente neurotóxicos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Animais experimentais***

Serão utilizados 40 ratos camundongos Balb-C isogênicos, machos, com 6-7 semanas de idade, obtidos junto ao Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (USP, São Paulo, SP) e distribuídos em 2 grupos experimentais, a saber:

**Grupo I** – camundongos injetados com DOX (n=20)

**Grupo II** – camundongos injetados com solução salina 0.9% (n=20)

Os animais pertencentes ao grupo I serão injetados com DOX (FAULDOXO® 10 mg), por via intraperitoneal, na dose semanal de 2 mg/kg durante 4 semanas e os animais pertencentes ao grupo II (controle) serão injetados com o mesmo volume de solução salina estéril 0,9%. Ao 7º dia após a 4ª aplicação de DOX ou de solução salina, os animais serão eutanasiados com solução de tiopental (60 mg/kg, via intraperitoneal) e submetidos à perfusão intracardíaca com formol tamponado a 10%. Terão seus encéfalos coletados, permanecendo por um período de 72 horas na referida solução fixadora e, após, sendo realizados cortes coronais para obtenção das seguintes regiões encefálicas - córtex frontal, estriado, hipocampo, hipotálamo e cerebelo (camadas molecular e granular). Proceder-se-á, a seguir, a subsequente desidratação, diafanização e inclusão em parafina do



material. Cortes transversais de 5  $\mu\text{m}$  serão obtidos, montados em lâminas histológicas e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E), sendo observados e fotografados em fotomicroscópio Olympus BHT-100. Cortes histológicos serão também confeccionados para coloração pela técnica de luxol fast blue (para observação das bainhas de mielina) e para marcação imuno-histoquímica da GFAP (para análise da população astrocitária).

#### ***Processamento do material para coloração por hematoxilina-eosina (H-E) e luxol fast blue***

Para a realização da técnica de H-E, as lâminas passarão 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 consistirá de passagens em concentrações decrescentes de álcoois, finalizando com água corrente por 1 minuto. Após a hidratação, as lâminas serão coradas com hematoxilina por 50 segundos e voltarão para água corrente para oxidação da hematoxilina por 2 a 4 minutos. A coloração pela eosina por 20 segundos será precedida de uma passagem em álcool absoluto. Após o final da coloração, a desidratação será realizada com 3 passagens com álcool absoluto. A clarificação será realizada com uma passagem em xilol. Outra passagem em xilol preparará a lâmina para a montagem, com resina sintética (Entellan® Merck) e lamínula sobre o corte.

Na técnica de luxol-fast-blue, as lâminas serão desparafinizadas e hidratadas até álcool 95% e, posteriormente, colocadas no corante Luxol Fast Blue a 0,1% na estufa a 60 °C, por 24 horas. Após essa etapa, as lâminas serão passadas em álcool 95% para retirada do excesso de corante e, assim, preparadas para a diferenciação que será realizada com carbonato de lítio a 0,05% por 20 segundos e uma passagem em álcool 70%. A contracoloração será realizada com cresil violeta por 6 minutos e, posteriormente, as lâminas serão desidratadas, clarificadas e montadas com meio de montagem sintético (Entellan® Merck).

#### ***Processamento do material para estudo imuno-histoquímico para GFAP***

Cortes histológicos de blocos selecionados serão colhidos em lâminas tratadas com silano (Sigma) a 4% em acetona, objetivando uma melhor aderência dos mesmos. Tais cortes serão desparafinados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol absoluto, etanol a 95%, a 80%, a 70% e a 50% e, a seguir, fervidos durante 15 minutos em forno de microondas convencional (potência máxima), imersos em tampão citrato

0,01 M (ácido cítrico 0,01 M e citrato de sódio 0,01 M, 1:3, pH 6,0). Depois de resfriados durante 20 minutos, a peroxidase endógena será bloqueada incubando-se as lâminas por 30 minutos em metanol contendo 10% de peróxido de hidrogênio 30 volumes.

Os cortes serão, então, incubados, durante 16 horas a 4°C em câmara úmida, com o anticorpo monoclonal primário anti-GFAP (Rabbit anti-cow GFA, code number ZO334, Dako, Glostrup, Danmark), padronizado na diluição 1:1000, a qual, por prévia titulação, foi considerada a mais adequada. Para tal diluição será utilizada solução contendo soro-albumina bovina a 5% em água destilada (1,25 ml), azida sódica a 5% em água destilada (2,5 ml) e solução salina tamponada (59 ml). Posteriormente, será realizada a incubação dos cortes por 30 minutos à temperatura ambiente com EnVision+ System-HRP (HRP, Rabbit DAB<sup>+</sup>, code number K4011, Dako, Glostrup, Danmark).

Os cortes serão contracorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética sob lamínula. Todas as reações serão acompanhadas por lâminas controle negativo, submetidas a todas as etapas do procedimento, porém suprimindo-se a aplicação do anticorpo primário.

#### ***Avaliação dos cortes em microscopia de luz e quantificação da reatividade astrocitária***

Todos os cortes submetidos à prova imuno-histoquímica serão analisados, em microscopia de luz (com objetiva de 40X), para identificação e avaliação da distribuição e do comportamento morfológico das células marcadas para GFAP (coradas em castanho). A quantificação da reatividade astrocitária será realizada por morfometria mediante utilização do software Image Pro Plus 6 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA), sendo os resultados dos grupos analisados estatisticamente. Serão confeccionados 3 cortes histológicos de cada área e animal analisado, sendo, a seguir, tomadas 10 fotomicrografias de cada lâmina/área.

#### ***Quantificação de citocinas***

Os encéfalos coletados serão pesados e colocados em tubos de polipropileno de 1,5mL contendo solução de inibidores de protease e congelados a -20°C. Posteriormente, cada encéfalo será descongelado, triturado e centrifugado a 10.000 rpm, com o sobrenadante coletado em novo tubo e congelado a -20°C para posterior quantificação das citocinas. As amostras serão, então, descongeladas e preparadas de acordo com as normas técnicas determinadas pelo fabricante do kit *CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD

Biosciences, Mountain View, CA, USA) para detecção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

### *Avaliação do estresse oxidativo tecidual*

Preferencialmente, as análises de avaliação do estresse oxidativo tecidual serão realizadas no mesmo dia da colheita ou, em caso de impossibilidade, em até 7 dias após congelamento em freezer -80°C.

Os encéfalos dos camundongos serão homogeneizados, sob banho de água-gelo, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, com remoção do conteúdo celular por centrifugação (5000 rpm, por 10 minutos, a 4°C). O sobrenadante será analisado para os seguintes parâmetros bioquímicos: (1) atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD, segundo EWING; JANERO, 1995), catalase (AEBI, 1994), glutathiona peroxidase e glutathiona redutase (MANNERVIK, 1985); (2) índices de lipoperoxidação pelo método do ácido tiobarbitúrico (FRAGA et al., 1988).

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. **121-126, 1984.**
- BENVENISTE, E.N. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. In: BLALOCK, J.E. **Neuroimmunoendocrinology**. 2. ed. Basel: Karger, 1992. p. 106-153.
- BIGNAMI, A.; DAHL, D. **Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury**. Austin, R.G. Landes, 1994. 108 p.
- BUTHERFIELD, A.D. The 2013 discovery award from the society for free radical biology and medicine: Selected discoveries from the Butterfield Laboratory of oxidative stress and its sequelae in brain in cognitive disorders exemplified by Alzheimer disease and chemotherapy induced cognitive impairment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 1, p. 157-174, 2014.
- EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, v. 54, p. 15-36, 1993.
- EWING, J.F.; JANERO, D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Anal. Biochem.**, v. 232, p. **243-248, 1995.**
- FERNAUD-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.

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.

FRAGA, C.G.; LEIBOVITZ, B.E.; TAPPEL, A.L. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: Characterization and comparison with homogenates and microsomes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 4, p. 155–161, 1988.

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

HURRIA, A.; SOMLO, G.; AHLES, T. Renaming "chemobrain". **Cancer Investigation**, v. 6, p. 373-377, 2007.

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

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

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.

MONCHON, J.F.M.; UZOR, N.-E.; KESLER, S.R.; WEFEL, J.S.; TOWNLEY, D.M.; NAGARAJA, A.S.; PRADEEP, S.; MANGALA, L.S.; SOOD, A.K.; TSVETKOV, A.S. TFEB ameliorates the impairment of the autophagy-lysosome pathway in neurons induced by doxorubicin. **Aging**, v. 8, p. 3507-3519, 2016.

MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 113, p. 490-495, 1985.

MONTGOMERY, D.L. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 145-167, 1994.

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.

PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H.F. **The fine structure of the nervous system**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1991. p. 212-272: The cellular sheaths of neurons.

PIERRE, J.; McDONALD, B. C. Neuroepidemiology of cancer and treatment-related neurocognitive dysfunction in adult-onset cancer patients and survivors. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 138, p. 297-309, 2016.

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.

SOFRONIEW, M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends in Neurosciences**, v. 32, p. 638-647, 2009.

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

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.

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.

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

WOHLFART, S.; KHALANSKY, A.; GELPERINA, S.; MAKSIMENKI, O.; BERNREUTHER, C.; GLATZEL, M.; KREUTER, J. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. **PLoS One**, v. 6, p. 5, 2011.

## **CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO**

**Meses 1 e 2** – Administração de doxorrubicina e de solução salina nos grupos experimentais

**Meses 3 e 4** – Colheita do material e processamento histológico para microscopia de luz (hematoxilina-eosina e *luxol fast blue*) e para imuno-histoquímica (GFAP)

**Meses 5 e 6** – Análise morfométrica dos cortes corados para GFAP

**Meses 7 e 8** – Análise dos parâmetros de estresse oxidativo (TBARS, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, catalase, superóxido dismutase, óxido nítrico)

**Meses 9 e 10** – Análise do perfil de citocinas nos encéfalos (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ).

**Meses 11 e 12** – Análise dos resultados e confecção do relatório final e do artigo científico