

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DA FUNÇÃO COGNITIVA EM CAMUNGONDOS SUBMETIDOS AO
AGENTE QUIMIOTERÁPICO CICLOFOSFAMIDA**

ANDRÉ BORBA REIRIZ

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Tese de Doutorado

Porto Alegre, novembro de 2008

ANDRE BORBA REIRIZ

**ESTUDO DA FUNÇÃO COGNITIVA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS
AO AGENTE QUIMIOTERÁPICO CICLOFOSFAMIDA**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Ciências
Médicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Porto Alegre

2008

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, pelo esforço, apoio e carinho na construção de todos sonhos de minha vida.

À Vanessa, minha esposa, grande amor, companheira incansável e compreensiva.

Ao meu pequeno Lorenzo, fonte inesgotável de motivação, resignificação da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas da Fundação SOAD, incansáveis na busca da inovação científica, aos companheiros do CECAN, em especial à Dra Rita Costamilan, verdadeira e inestimável colaboradora.

Ao Prof. Gilberto Schwartzmann, modelo de motivação e sabedoria, verdadeiro mestre.

Ao Prof. Rafael Roesler, incansável e paciente orientador, exemplo de simplicidade e brilhantismo científico.

RESUMO

Evidências clínicas sugerem que pacientes sob tratamento quimioterápico apresentam alguma forma de dano cognitivo. Isso tem sido observado principalmente em estudos com mulheres submetidas ao tratamento adjuvante do câncer de mama. Devido ao potencial impacto clínico dessa complicação, torna-se necessário um maior número de estudos a respeito dos mecanismos envolvidos na disfunção cognitiva ocasionada por agentes quimioterápicos. Nesse sentido, é fundamental o desenvolvimento de modelos animais que aprimorem o conhecimento dessa possível disfunção. Em nosso estudo, foi avaliado o efeito da ciclofosfamida, agente quimioterápico largamente utilizado em oncologia, em especial na terapia adjuvante do câncer de mama. Foi utilizado um modelo animal com camundongos machos adultos que receberam injeção sistêmica da ciclofosfamida nas doses de 8, 40 ou 200 mg/kg ou controle com solução salina. Os animais foram treinados em tarefa de esquiva inibitória e comportamento em campo aberto, sendo avaliados após um dia ou sete dias do tratamento. Os camundongos tratados com ciclofosfamida nas doses de 40 ou 200 mg/kg um dia antes do teste mostraram significativo dano de retenção de memória. Esses resultados sugerem dano cognitivo agudo. O experimento controle não afetou o comportamento em campo aberto, o que enfraquece a possibilidade de dano por ação na locomoção, na motivação ou na ansiedade. Com base em nosso estudo e ampla revisão bibliográfica, é possível considerar um dano cognitivo agudo após injeção única de ciclofosfamida em modelo de camundongos de memória aversiva. Futuros estudos são necessários para caracterizar os déficits cognitivos induzidos pela quimioterapia em modelos animais e investigar os mecanismos responsáveis pelos diferentes efeitos da ciclofosfamida na memória em diferentes modelos experimentais.

ABSTRACT

Cognitive dysfunction has been reported following cytotoxic therapy, especially in patients receiving adjuvant treatment for breast cancer. Data on experimental models for the study of the mechanisms involved in cognitive dysfunction are scanty. Therefore, new animal models are needed to better understand the causes of cognitive dysfunction following cytotoxic therapy. We examined the effects of cyclophosphamide, a chemotherapeutic agent widely used in oncology, and important in adjuvant treatment of breast cancer, in an in vivo rodent model. In our experiments, male mice were given a systemic injection of cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) or saline solution as control. The animals were trained and tested 1 day and 7 days after the injection, in step-down inhibitory avoidance and open-field behavior. Mice treated with cyclophosphamide at 40 or 200 mg/kg 1 day before test showed significant impairment of 24-hour memory retention. Thus, such results suggest acute cognitive dysfunction. The control experiment did not show impairment in the open field behavior, indicating that drug effects on inhibitory avoidance could not be attributed to drug-induced alterations in locomotion, motivation, or anxiety. Based on our results and literature review, we were able to confirm the occurrence of an acute impairment of cognitive function with a single dose of cyclophosphamide in a mice model of aversive conditioning. Further studies are required to further characterize cognitive deficits induced by cancer chemotherapy in animal models.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS.....	4
SUMÁRIO.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Memória relacionada ao medo	15
2.2 Memória e avaliação experimental	16
2.3 Ciclofosfamida	19
2.4 Quimioterapia e dano cognitivo	20
2.5 Estudos pré-clínicos	22
2.6. Estudos Clínicos	22
2.6.1 Câncer de Mama	22
2.6.2 Outros tumores	23
3 OBJETIVOS DO ESTUDO	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1	31
ABSTRACT.....	33
1 INTRODUCTION	34
2 MATERIALS AND METHODS.....	36
2.1 Animals	36
2.2 Drugs and pharmacological procedures	36
2.3 Behavioral procedures.....	37
2.4 Statistics	37
3 RESULTS	39
4 DISCUSSION	40
REFERENCES	43

TERCEIRA PARTE- ARTIGO 2.....	50
ABSTRACT.....	52
1 INTRODUCTION	53
2 PHYSIOPATHOLOGY	54
3 PRE-CLINICAL TRIALS	56
4 CLINICAL TRIALS	57
4.1 Breast cancer.....	57
4.2 Other Tumors.....	58
REFERENCES	61
QUARTA PARTE – ARTIGO 1 - TRADUÇÃO PARA LÍNGUA PORTUGUESA	63
RESUMO	65
1 INTRODUÇÃO.....	66
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
2.1 Animais experimentais.....	68
2.2 Drogas e procedimentos farmacológicos	68
2.3 Procedimentos neurocomportamentais	68
2.4 Análise estatística.....	69
3 RESULTADOS	71
4 DISCUSSÃO.....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
QUINTA PARTE - ARTIGO 2 - TRADUÇÃO PARA LÍNGUA PORTUGUESA	82
RESUMO	84
1 INTRODUÇÃO.....	85
2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS.....	86
3 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS.....	88
4 ESTUDOS CLÍNICOS	89
4.1 Câncer de Mama	89
4.2 Outros Tumores.....	90
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS.....	96

LISTA DE FIGURAS

PARTE 1

- FIG. 1 - Aparato de habituação ao campo aberto 18
- FIG. 2 - Aparato de esquiva inibitória (caixa de Albarsch) 18

PARTE 2

- FIG. 3 - 24-h inhibitory avoidance retention in mice given an i.p. injection of saline (NaCl 0.9%) or cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) 24 h before training.. 45
- FIG. 4 - 24-h inhibitory avoidance retention in mice given an i.p. injection of saline (NaCl 0.9%) or cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) 1 week before training..... 45
- FIG. 5 - Open field behavior in mice given an i. p. injection of cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) or control 24 h before behavioral testing 47
- FIG. 6 - Open field behavior in mice given an i. p. injection of cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) or control 1 week before behavioral testing. 49

PARTE 3

- FIG. 7 - Infusão intra-peritoneal de solução salina (NaCl 0.9%) ou ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg) em camundongos, 24 horas antes do teste..... 77
- FIG. 8 - Infusão intra-peritoneal de solução salina (NaCl 0.9%) ou ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg) em camundongos, 1 semana antes do teste..... 77
- FIG. 9 - Habituação em campo aberto com camundongos recebendo injeção intra-peritoneal de ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg) ou controle salino, 24 h antes do teste comportamental) 79
- FIG. 10 - Habituação em campo aberto com camundongos recebendo injeção intra-peritoneal de ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg) ou controle salino, 1 semana antes do teste comportamental. 81

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA - Ácido desoxirribonucléico

5-FU - 5-fluorouracil

ABL - Amígdala basolateral

4-HC - 4-hidroxiciclofosfamida

FNT - Fator de necrose tumoral

SBNeC - Brazilian Society for Neuroscience and Behavior

NMTS - non-matching to sample

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O tratamento do câncer através da quimioterapia envolve conhecidos efeitos adversos agudos como mielossupressão, vômitos, alopecia, mucosite oral e diarreia. A melhora dos resultados curativos tem tornado as complicações tardias, razão de especial interesse, com destaque para a disfunção cognitiva que impõe limitações sociais e dificuldade na execução de múltiplas tarefas. O número de sobreviventes livres de doença tem aumentado rapidamente em pacientes com neoplasias malignas de diagnóstico precoce.

A função cognitiva inclui habilidades como memória, atenção, aprendizado, cálculo e linguagem. Alguns estudos têm sugerido que a disfunção cognitiva pode ocorrer em pacientes sob tratamento quimioterápico, especialmente na terapia adjuvante do câncer de mama. Vam Dam e cols¹. demonstraram disfunção cognitiva em mulheres sob alta dose de quimioterapia e Schagen e cols.² relataram que os pacientes recebendo quimioterapia apresentavam mais problemas relacionados à memória e à concentração. Em metanálise de 2003, incluindo 838 pacientes, evidências de maior risco de disfunção cognitiva foram verificadas em pacientes recebendo quimioterapia³.

Surpreendentemente, poucos estudos têm avaliado os efeitos da quimioterapia na função cognitiva e diversas dificuldades metodológicas são vistas, incluindo a ausência de testes neuropsicológicos que considerem a heterogeneidade do contexto. Além disso, os poucos estudos possuem pequeno número de pacientes, não considerando fatores de confusão como perfil hormonal, medicações concomitantes, como por exemplo, os corticoesteróides e os antagonistas de receptores da serotonina, sendo complexa a exclusão de mecanismos indiretos de dano cognitivo.

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar o dano cognitivo relacionado à quimioterapia, incluindo a liberação de citocinas do tecido tumoral (interleucina 1, 2, 6, interferon e fator de necrose tumoral). Em animais as citocinas produziram anorexia, letargia, dificuldade de aprendizado e depressão⁴. Algumas evidências consideram que ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil reduziram a resistência celular ao estresse oxidativo, causando dano na barreira hematoencefálica e, desse modo, permitindo a entrada de moléculas neurotóxicas no cérebro⁵.

Recentemente, 2 estudos pré-clínicos, utilizando modelos animais, avaliaram a relação entre agentes quimioterápicos e função cognitiva. Lee e cols.⁵ utilizaram ciclofosfamida e 5-fluorouracil(5-FU) ou solução salina em ratos e não verificaram dano cognitivo até 42 semanas de recuperação da quimioterapia. Porém Winocur e cols.⁶ utilizaram metotrexate e 5-FU e descreveram dano cognitivo em modelo de camundongos.

A carência de conhecimento sobre mecanismos de fisiopatologia reforça a necessidade de desenvolver novos modelos animais, utilizando diferentes agentes anticâncer e testes. Ciclofosfamida é um agente quimioterápico que age como um agente alquilante do DNA, sendo largamente utilizado nos diversos protocolos de pacientes com câncer de mama.

Estudos em seres humanos ficam restritos a pacientes com doenças neurológicas⁷ e avaliações metabólicas baseadas em neuroimagem⁸. Com o uso de modelos animais é possível avaliar a influência de sistemas neuroendócrinos através de manipulações farmacológicas, genéticas ou ablativas, possibilitando a identificação e interação das estruturas cerebrais envolvidas na memória relacionada ao medo. A memória relacionada ao medo aprendido pode ser acessada através de estímulo condicionado⁹, em ratos ou em camundongos e um

dos modelos mais utilizados para avaliação da memória aversiva é o procedimento de esquiva inibitória. Evidências sugerem que, em tarefas desse tipo, o hipocampo esteja envolvido nos aspectos contextuais e espaciais da memória, enquanto que a amígdala esteja envolvida nos aspectos aversivos (emocionais)^{10,11}.

No presente estudo é proposto a avaliação da ciclofosfamida em camundongos, a fim de definir possível dano cognitivo, utilizando procedimentos comportamentais como a esquiva inibitória e a habituação ao campo aberto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Memória relacionada ao medo

A amígdala, estrutura subcortical situada no lobo temporal medial, é componente chave no circuito neural do medo e das emoções^{9,12}. A amígdala está envolvida nos processos de ansiedade, de alerta e de aversão, sendo responsável pelo conteúdo emocional que determinadas memórias carregam¹³. Eventos em contexto emocional tipicamente são mais facilmente lembrados que eventos neutros, e este parece ser um papel da amígdala. Anatomicamente, consiste de um complexo de mais de 10 núcleos, sendo o complexo basolateral, ou a amígdala basolateral, sua maior região. Essa por sua vez apresenta extensas conexões intra e internucleares, além de projeções aferentes e eferentes comunicando-a com diversas outras regiões cerebrais, incluindo o hipocampo¹⁴.

Lesões ablativas da amígdala causam diminuição da resposta a estímulos ameaçadores em pássaros, gatos, coelhos, cães, macacos, ratos, e inclusive em seres humanos¹⁵. A estimulação química e elétrica da amígdala em animais desencadeia diversas respostas comportamentais e autonômicas, como congelamento (*freezing*), defesa, alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca, manifestações usualmente associadas ao medo¹⁶. Em humanos, a estimulação elétrica da amígdala direita provoca emoções negativas, especialmente medo e tristeza, enquanto a estimulação da amígdala esquerda induz tanto sensações prazerosas, como felicidade, quanto desagradáveis, como o medo, a ansiedade e a tristeza¹⁷.

A relação da amígdala com a memória começou a ser demonstrada com observações de que a estimulação elétrica dessa região pode causar amnésia

retrógrada¹⁸. Lesões ou inativações funcionais específicas da amígdala basolateral (ABL), excluindo outros núcleos, possuem o efeito de alterar a ação facilitadora de diversos hormônios relacionados ao estresse e a uma variedade de drogas na consolidação da memória^{19,20,21}. A ABL é a estrutura responsável pela modulação da memória relacionada às emoções^{10, 22}. É provável que a ação fundamental da ABL nos processos de memória seja modular a consolidação da memória motivada pelo medo (inato e adquirido) em outras regiões cerebrais¹², em especial o hipocampo²³.

O hipocampo apresenta uma organização celular laminar, possibilitando a identificação de três regiões distintas denominadas de CA1, CA2 e CA3, discriminações baseadas no tamanho e conexões das células piramidais²⁴. Lesões específicas da região CA1 do hipocampo dorsal em humanos causam déficits de memória qualitativamente similares a ressecções amplas do hipocampo²⁵. O conjunto de informações atuais sugere que, em tarefas de esquiva inibitória, o hipocampo esteja envolvido nos aspectos contextuais e espaciais da memória, enquanto que a amígdala esteja envolvida nos aspectos aversivos (emocionais)^{26,27}.

2.2 Memória e avaliação experimental

A capacidade de recordar situações ameaçadoras é de extrema importância para a sobrevivência das espécies. Desse modo, a geração da sensação de medo de forma indiscriminada ou exacerbada pode ser patológica. Assim, a compreensão dos mecanismos neurais envolvidos na formação da memória motivada pelo medo propicia um melhor entendimento da fisiologia do sistema nervoso central e

desenvolvimento de estratégias terapêuticas para distúrbios envolvendo contextos emocionais.

Com o uso de modelos animais é possível avaliar a influência de diversos sistemas neuroendócrinos através de manipulações farmacológicas, genéticas ou ablativas, possibilitando a identificação e interação das estruturas cerebrais envolvidas na memória relacionada ao medo.

A memória relacionada ao medo aprendido pode ser acessada através de estímulo condicionado, baseado no paradigma Pavloviano⁹. Em ratos ou camundongos, um dos modelos mais utilizados para avaliação da memória aversiva é o procedimento de esquiva inibitória. Em nosso meio, o modelo desenvolvido utiliza a caixa de Albarsch. O aparato de Albarsch consiste de uma caixa de acrílico de 50 x 25 x 25 cm, com uma grade de barras de aço paralelas de 1 mm de diâmetro na base e uma plataforma de 7 cm de comprimento e 2.5 cm de altura junto à parede esquerda. Ao ser posicionado na caixa sobre plataforma, o animal tende a descer para explorar o ambiente, e o estímulo inicialmente neutro (descida da plataforma para a grade) adquire significado biológico por ser associado a um estímulo aversivo, no caso, a um choque elétrico de leve intensidade (estímulo não condicionado)^{28,29,30}. Na realização dessa tarefa, a região CA1 do hipocampo e a amígdala basolateral estão criticamente envolvidas³¹.



FIG. 1 - Aparato de habituação ao campo aberto



FIG. 2 - Aparato de esquia inibitória (caixa de Albarsch)

2.3 Ciclofosfamida

Sendo o agente alquilante mais frequentemente utilizado, a ciclofosfamida é usada para o tratamento de câncer de mama, em combinação com doxorrubicina³², docetaxel³³ ou metotrexate e 5-fluorouracil³⁴, aquela também possui destaque no tratamento de linfomas³⁵ e de tumores pediátricos³⁶. Em altas doses é utilizada conjuntamente com o transplante de medula óssea³⁷.

A Ciclofosfamida é inativa *in vitro*, sendo metabolizada por enzimas do complexo P-450 na sua forma ativa, no fígado. Como um agente alquilante, a ciclofosfamida reage com as bases do DNA, produzindo uma ligação cruzada entre os filamentos de DNA, assim a menos que haja uma reparação, as células não terão uma replicação efetiva³⁸.

O produto liberado para circulação é o 4-HC³⁹, que será inativado pela enzima aldeído desidrogenase⁴⁰, assim células com altos níveis dessa enzima serão resistentes aos metabólitos da ciclofosfamida^{41,42}. Baseado nessa informação é sabido que células tronco hematopoiéticas e megacariócitos contêm altos níveis dessa enzima, assim como células epiteliais no intestino delgado e membranas mucosas, explicando a razão pela qual a ciclofosfamida produz um período mais curto de mielossupressão, preservando plaquetas e gerando menor toxicidade gastrintestinal e mucosite que outros agentes alquilantes⁴³. É utilizada em diferentes níveis de dose, por via oral ou endovenosa, de acordo com a indicação em doença auto-imune, quimioterapia combinada ou associada ao transplante de medula óssea. O potencial dano cognitivo tem mecanismo sugerido baseado em dano oxidativo⁵ e no aumento da permeabilidade hemato-encefálica.

2.4 Quimioterapia e dano cognitivo

Diversos mecanismos têm sido considerados na explicação de possíveis déficits cognitivos relacionados à quimioterapia, incluindo a participação de citocinas liberadas pelo tecido neoplásico (interleucina 1, 2, 6, interferon e fator de necrose tumoral-FNT) que em modelos animais demonstraram produzir anorexia, letargia, depressão e distúrbio de aprendizado⁴. Meyers et al⁴⁴. sugerem maior distúrbio cognitivo em pacientes sob tratamento imunoterápico (interferon, interleucina e FNT). Distúrbios vasculares e alterações hormonais também poderiam predispor déficit cognitivo em razão da tendência trombogênica por dano endotelial⁴⁵ e também pela conhecida presença de receptores estrogênicos no tecido cerebral os quais modulam humor e função cognitiva⁴⁶. Sabe-se que em torno de 70% das mulheres pré-menopáusicas têm amenorréia induzida pela quimioterapia, essa informação poderia explicar a disfunção de cognição⁴⁷. A semelhança de estrógenos, os andrógenos têm controle sobre a organização cerebral, e estudos em modelos animais mostram a testosterona com influência sobre receptores e neurotransmissores.⁴⁸

Também se cogita que o dano cerebral possa ser causado por anemia secundária à quimioterapia, fato já especulado no estudo de Jacobsen et al⁴⁹, onde pacientes com decréscimo da hemoglobina apresentavam maiores problemas de memória e de concentração. Eritropoietina recombinante humana pode atravessar a barreira hemato-encefálica⁵⁰ e exercer efeito neuroprotetor através da eritropoiese e da ação excitatória sobre receptores neuronais⁵¹.

Evidências sugerem que ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil reduziram a resistência celular a danos oxidativos e aumentariam a permeabilidade da barreira hemato-encefálica a moléculas neurotóxicas⁵. Ao analisar outros agentes

quimioterápicos como cisplatina, ifosfamida e citarabina, percebemos toxicidade neurológica na forma de convulsões e de encefalopatia⁵². A maioria dos agentes quimioterápicos administrados sistemicamente não atravessa a barreira hematoencefálica em doses significantes, porém a penetração no encéfalo pode ser modificada pela variabilidade genética nos transportadores da barreira hematoencefálica. Estudos utilizando tomografia com emissão de pósitrons (PET) demonstrou níveis detectáveis de cisplatina, carmustina e paclitaxel radiomarcados⁵³. Dados oriundos de estudos em animais sugerem que doses muito pequenas de quimioterápicos, freqüentemente utilizados, podem causar morte celular e reduzida divisão celular em estruturas cerebrais cruciais para cognição, mesmo com doses que não produzam efetiva morte de células neoplásicas⁵⁴. Em razão de a ciclofosfamida estar presente nos diversos protocolos quimioterápicos de câncer de mama, sendo essa patologia a razão do maior volume de indicações de quimioterapia com intenção curativa, essa droga tem sido alvo de especial interesse quanto ao seu impacto na função cognitiva dos pacientes.

As alterações cognitivas associadas com a quimioterapia são habitualmente sutis, ou seja, a função está reduzida, porém dentro de padrões de normalidade e ocorrendo em diversos domínios de cognição, incluindo memória verbal, memória de trabalho, função executiva, atenção, concentração, tempo de reação e velocidade motora. Estudos que utilizaram técnicas de imagem descreveram alterações estruturais e funcionais associadas a quimioterapia. Foram evidenciadas redução no volume de estruturas cerebrais importantes para função cognitiva, tais como o córtex frontal. Recentes dados de um estudo longitudinal de pacientes com câncer de mama e que foram avaliadas com ressonância magnética estrutural e funcional, antes do tratamento, um e 12 meses após o tratamento, apresentaram um padrão reduzido de ativação em áreas frontais durante uma tarefa em memória de trabalho.

2.5 Estudos pré-clínicos

Em 2003, Dr.Koolhaas descreveu modelo animal com alta dose de quimioterapia de forma única e avaliação cognitiva 6 semanas após, demonstrando anormalidades no aprendizado espacial e na ansiedade⁵⁵. Lee et al.⁵ descrevem modelo de ratos que receberam altas doses de 5-fluorouracil, ciclofosfamida ou solução salina, por 5 ciclos em intervalos de 4 semanas, sem evidência de déficit cognitivo, inclusive com melhora do aprendizado e da plasticidade sináptica. Recente estudo avaliou o papel do 5-fluorouracil e metotrexate na função cognitiva em camundongos e evidenciou deterioração da performance de aprendizado e de memória em testes de 2 a 5 semanas após término da quimioterapia⁶.

2.6. Estudos Clínicos

2.6.1 *Câncer de Mama*

A maioria dos estudos clínicos que avaliam déficit cognitivo em pacientes oncológicos envolve pacientes portadores de neoplasia de mama e sob tratamento adjuvante. Vam Dam e cols.¹ avaliaram pacientes definidas como de alto risco, recebendo quimioterapia em dose convencional, alta dose e controle, seguido de radioterapia loco-regional e tamoxifeno. Dano cognitivo foi evidenciado em 32%, 17% e 9% dos pacientes sob dose alta, convencional e controle, respectivamente. O risco cognitivo foi significativamente maior em mulheres sob alta dose de quimioterapia ($p=0,043$, odds ratio 8,2).

Em estudo de Schagen e cols.², 39 pacientes com câncer de mama inicial receberam tratamento quimioterápico utilizando ciclofosfamida, metotrexate e 5-Fluorouracil, e 34 pacientes foram controles sem terapia adjuvante, assim 28% dos pacientes no grupo de tratamento quimioterápico apresentaram dano cognitivo, enquanto no grupo controle, somente 12%.

Wieneke⁵⁷ evidenciou dano em teste neuropsicológico, em 21 dentre 28 pacientes, após quimioterapia adjuvante em câncer de mama inicial. Brezden et al⁵⁸ demonstraram maior déficit cognitivo em 31 pacientes recebendo quimioterapia, com dano demonstrado em memória e na linguagem.

Um pequeno estudo prospectivo, conduzido por Wefel et al⁵⁹, avaliou 18 pacientes e evidenciou um terço de disfunção cognitiva na avaliação inicial e dois terços ao término da quimioterapia. Recentemente em 2005, Fan et al⁶⁰ publicaram a maior avaliação prospectiva de fadiga, sintomas pós-menopausa e função cognitiva em 104 pacientes submetidas à quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante para câncer de mama, revelando recuperação desse dano nas avaliações após 1 e 2 anos.

Duas metanálises sugerem disfunção cognitiva em pacientes recebendo tratamento quimioterápico, Anderson-Hanley e cols.⁶¹ compilaram dados de 29 estudos e 838 pacientes, revelando evidência de disfunção cognitiva, enquanto Jansen e cols.⁶² reafirmaram essa disfunção, em publicação de 2005 incluindo 16 estudos.

2.6.2 *Outros tumores*

Meyers et al⁶³ avaliaram a função cognitiva em pacientes com câncer de pulmão de pequenas células, após quimioterapia e radioterapia sobre o tórax, não havendo evidência de diferença nos 25 pacientes analisados. Gregor et al⁶⁴ analisaram pacientes sob remissão completa após quimioterapia e com diagnóstico de carcinoma de pulmão de pequenas células. Foi realizada randomização para radioterapia profilática em sistema nervoso central e as avaliações após essas terapias, não demonstraram deterioração cognitiva.

Chen et al⁶⁵ realizaram pequeno estudo com 37 pacientes acima de 70 anos e diversos tumores sólidos, sem demonstrar dano cognitivo ao final do tratamento quimioterápico.

Em 2003, Malmstrom et al⁶⁶ mostraram em 40 pacientes com neoplasia ovariana submetidas a tratamento quimioterápico, um declínio de memória na comparação com mulheres saudáveis. Em análise de 65 pacientes com câncer de próstata avançado, foi evidenciado desempenho deteriorado em testes de memória naqueles recebendo goserelina⁶⁷.

3 OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da ciclofosfamida em modelo animal de memória aversiva e comportamento relacionado à locomoção, à motivação e à ansiedade.

3.2 Objetivos Específicos

a. Avaliar o papel agudo da infusão única de ciclofosfamida sobre a memória aversiva, no teste de esquiva inibitória em camundongos;

b. Avaliar o papel agudo da infusão única de ciclofosfamida sobre o comportamento relacionado à locomoção, à motivação e à ansiedade, através do teste de habituação ao campo aberto;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Dam FSAM, Schagen SB, Muller MJ, et al. Impairment of cognitive function in women receiving adjuvant treatment for high-risk breast cancer: high dose versus standard-dose chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 210-218.
2. Schagen SB, Van Dam FSAM, Muller JM, et al. Cognitive deficits after postoperative adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 640-650.
3. Anderson-Hanley C, Sherman ML, Riggs R, et al. Neuropsychological effects of treatments for adults with cancer: a meta-analysis and review of the literature. *J Int Neuropsychol Soc* 2003; 9: 967-982.
4. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 445-452.
5. Lee GD, Longo DL, Wang Y, et al. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 198-205.
6. Winocur G, Vardy J, Binns MA, et al. The effects of the anti-cancer drugs, methotrexate and 5-fluoracil, on cognitive function in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2006; 85: 66-75.
7. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957; 20: 11-21.
8. Drobyshevsky A, Baumann SB, Schneider W. A rapid fMRI task battery for mapping of visual, motor, cognitive, and emotional function. *Neuroimage* 2006; 31(2): 732-744.
9. Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G, et al. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell* 2002; 111: 905-918.
10. Roesler R, Schroeder N, Vianna MR, et al. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res* 2003; 13, 975(1-2): 207-213.
11. Buckley MJ. The role of the perirhinal cortex and hippocampus in learning, memory and perception. *Q J Exp Psychol B* 2005; 58(3-4): 246-268.
12. Packard MG, Wingard JC. Amygdala and emotional modulation of the relative use of multiple memory systems. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 82: 243-252.
13. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learning and Memory* 1997; 68: 285-316.

14. Sah P, Faber SL, De Armentia ML, Power J. The amygdaloid complex: Anatomy and Physiology. *J Physiol Rev* 2003; 83:803-834.
15. Ono T, Nishijo H, Uwano T. Amygdala role in conditioned associative learning. *Progr neurobiol* 1995; 46: 401-422.
16. Ursin H, Kaada BR. Functional localization within the amygdaloid complex in the cat. *Eletroencephalogr Clin Neurophysiol* 1960; 12: 1-20.
17. Lanteaume L, Khalifa S, Regis J, et al. Emotion induction after direct intracerebral stimulations of human amygdale. *Cereb Cortex* 2006; jul 31. Disponível em <http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&CMD=pubmed>.
18. Goddard GV. Amygdaloid stimulation and learning in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1964; 58: 23-30.
19. McGaugh JL. Memory-a century of consolidation. *Science* 2000; 287: 248-251.
20. Roozental B, Sapolsky RM, McGaugh JL. Basolateral amygdale lesions block the disruptive effects of long-term adrenalectomy on spatial memory. *Neuroscience* 1998; 84: 453-465.
21. Roesler R, Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of 8-Br-cAMP infused into the entorhinal cortex of rats after training. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 905-910.
22. Vazdarjanova A, McGaugh JL. Basolateral amygdale is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. *J Neurosci.* 1999; 19(15): 6615-6622.
23. Nakao K, Matsuyama K, Matsuki N, et al. Amygdala stimulation modulates hippocampal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 28; 101(39): 14270-14275.
24. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, et al. A citologia dos neurônios. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, eds. *Princípios da neurociência*. 4ª ed. McGraw-Hill Companies, Inc; 2000 p 78.
25. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, et al. Aprendizagem e memória. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, eds. *Princípios da neurociência*. 4ª ed. McGraw-Hill Companies, Inc; 2000 p 1233.
26. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31-39.
27. Whitlock JR, Heynen AJ, Schuler MG, et al. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 2006; 313(5790): 1093-1097.
28. Roesler R, Luft T, Oliveira SHS, et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2006; 51: 350-357.

29. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, et al. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 2003; 24(7): 1069-1074.
30. Bianchin MM, Mello e Souza T, Medina JH, et al. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not working, short and long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 71:127-131.
31. McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B. Involvement of the amygdala in memory storage: Interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13508-13514.
32. Fisher B, Anderson S, Wickerham DL, et al. Increased intensification and total dose of cyclophosphamide in a doxorubicin – cyclophosphamide regimen for the treatment of primary breast cancer: findings from NSABP B-22. *J Clin Oncol* 1997; 15(5): 1858.
33. Nabholz JM, Pienkowski T, Mackey J, et al. Phase III trial comparing TAC(docetaxel, doxorubicin, cyclophosphamide) with FAC(5-fluoracil, doxorubicin, cyclophosphamide) in the adjuvant treatment of node positive breast cancer(BC) patients. *N Engl J Med* 2005; 352: 2302.
34. Falkson G, Tormey DC, Carey P, et al. Long-term survival of patients treated with combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27(8): 973.
35. Chao NJ, Rosenberg SA, Horning SJ. CEPP(B): an effective and well-tolerated regimen in poor-risk, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1990; 76(7): 1293.
36. McCowage G, Tien R, McLendon R, et al. Successful treatment of childhood pilocytic astrocytomas metastatic to the leptomeninges with high-dose cyclophosphamide. *Med Pediatr Oncol* 1996; 27(1): 32.
37. Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983; 309(22): 1347.
38. Colvin OM. *Cancer, Principles and Practice of Oncology. Antitumor Alkylating Agents-Section 3.* 6th ed 2001; 363.
39. Colvin M, Hilton J. Pharmacology of cyclophosphamide and metabolites. *Cancer Treat Rep* 1981; 3:89.
40. Hilton J. Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant LI210 leukemia. *Cancer Res* 1984; 44(11): 5156.
41. Russo JE, Hilton J. Characterization of cytosolic aldehyde dehydrogenase from cyclophosphamide resistant LI210 cells. *Cancer Res* 1988; 48(11): 2963.

42. Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, et al. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1990; 75(10): 1947.
43. Russo JE, Hilton J, Colvin OM. The role of aldehyde dehydrogenase isozymes in cellular resistance to the alkylating agent cyclophosphamide. *Prog Clin Biol Res* 1989;290:65.
44. Meyers CA, Abbruzzese JL. Cognitive functioning in cancer patients: effects of previous treatment. *Neurology* 1992; 42: 434-436.
45. Levine MN, Gent M, Hirsh J, et al. The thrombogenic effect of anticancer drug therapy in women with stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1988, 318: 404-407.
46. McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999; 20: 279-307.
47. Reyno LM, Levine MN, Skingley P, et al. Chemotherapy-induced amenorrhoea in a randomized trial of adjuvant chemotherapy duration in breast cancer. *Eur J Cancer* 1992; 29: 21-23.
48. Nakamura N, Fujita H, Kawata M. Effects of gonadectomy on immunoreactivity for choline acetyltransferase in the cortex, hippocampus, and basal forebrain of adult male rats. *Neurosci* 2002; 109: 473-485.
49. Jacobsen PB, Thors CL, Cawley M, et al. Relation of decline in hemoglobin to cognitive functioning and fatigue during chemotherapy treatment. *Proc ASCO* 2002; 21: 386(abstr).
50. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10526-10531.
51. Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA : oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000; 30: 271-278.
52. Minisini A, Atalay G, Bottomley A, et al. What is the effect of systemic anticancer treatment on cognitive function? *The Lancet Oncology* 2004; 5: 273-282.
53. Ahles TA, Saykin AJ. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. *Nature Reviews* 2007; 7: 192-201.
54. Dietrich J, Han R, Yang Y, et al. CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol* 2006; 5:22 (Epub ahead of print).
55. Tannock IF, Ahles TA, Ganz PA, et al. Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer : report of a workshop. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2233:2239.

56. Reiriz AB, Roesler R, Schwartzmann G, et al. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5000-5001.
57. Wieneke MH, Dienst ER. Neuropsychological assessment of cognitive functioning following chemotherapy for breast cancer. *Psychooncology* 1995; 4: 61-66.
58. Brezden CB, Phillips KA, Abdollel M, et al. Cognitive function in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2695-2701.
59. Wefel JS, Lenzi R, Theriault RL, et al. The cognitive sequelae of standard-dose adjuvant chemotherapy in women with breast carcinoma: results of a prospective, randomized, longitudinal trial. *Cancer* 2004; 100: 2292-2299.
60. Fan HGM, Tchen NH, Yi QL, et al. Fatigue, menopausal symptoms and cognitive function in women after adjuvant chemotherapy for breast cancer: 1 and 2 year follow-up of a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8025-8032.
61. Anderson-Hanley C, Sherman ML, Riggs R, et al. Neuropsychological effects of treatments for adults with cancer: a meta-analysis and review of the literature. *J Int Neuropsychol Soc* 2003; 9:967-982.
62. Jansen CE, Miaskowski C, Dodd M, et al. A metaanalysis of studies of the effects of cancer chemotherapy on various domains of cognitive function. *Cancer* 2005; 104: 2222-2233.
63. Meyers CA, Byrne KS, Komaki R. Cognitive deficits in patients with small-cell lung cancer before and after chemotherapy. *Lung Cancer* 1995; 12:231-235.
64. Gregor A, Cull A, Stephens RJ, et al. Prophylactic cranial irradiation is indicated following complete response to induction therapy in small-cell lung cancer: results of a multicentre randomised trial. *Eur J Cancer* 1997;33:1752-1758.
65. Chen H, Cantor A, Meyer J, et al. Can older patients tolerate chemotherapy? A prospective pilot study. *Cancer* 2003; 97: 1107-1114.
66. Malmstrom H. Cognitive functions in patients with ovarian cancer receiving chemotherapy. *Proc ASCO* 2003;22:462.
67. Green HJ, Pakenham KI, Headley BC, et al. Altered cognitive function in men treated for prostate cancer with LHRH analogues and cyproterone acetate: a randomized controlled trial. *BJU Int* 2002; 90: 427-432.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice

André Borba Reiriz¹, Gustavo Kellermann Reolon^{1,2}, Thales Preissler¹, Joémerson Osório Rosado³, João Antônio Pegas Henriques³, Rafael Roesler^{1,2} and Gilberto Schwartzmann^{2,4}

¹ Cancer Research Laboratory, Academic Hospital Research Center, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

² Cellular and Molecular Neuropharmacology Research Group, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Department of Internal Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, and South American Office for Anticancer Drug Development, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Campus Centro/UFRGS, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3316 3183, Fax: +55 51 3316 6084, E-mail: rroesler@terra.com.br

ABSTRACT

Studies have suggested that cognitive dysfunction may occur in patients submitted to chemotherapy, mostly as adjuvant treatment for breast cancer. The studies have taken the effects of chemotherapy on cognitive function and several methodological difficulties were seen including a lack of neuropsychological tests considering the heterogeneity of this context. Lack of knowledge about mechanisms suggests research addressing new animal models using different anti-cancer drugs and tests. In our experiments, male mice were given a systemic injection of cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) or saline solution as control. The animals were trained and tested 1 day and 7 days after the injection, in step-down inhibitory avoidance and open-field behavior. Mice treated with cyclophosphamide at 40 or 200 mg/kg 1 day before test showed significant impairment of 24-hour memory retention. Thus, such results suggest acute cognitive dysfunction and the control experiment did not impair the open field behavior, indicating that the impairing effects of the drug on inhibitory avoidance could not be attributed to drug-induced alterations in locomotion, motivation, or anxiety. Further studies are required to characterize cognitive deficits induced by cancer chemotherapy in animal models and to investigate the mechanisms underlying the differential effects of cyclophosphamide on memory in different experimental paradigms.

Key words: cognitive function; cyclophosphamide; mice

1 INTRODUCTION

The late complications of anti-cancer drugs have special interesting including cognitive dysfunction because of the improvement of curative results, social limitations and impairment of multiple tasks¹. The number of survivors from long-term disease who are disease free is increasing rapidly among patients diagnosed with early-stage cancer.

Cognitive function includes skills such as memory, attention, learning, calculation and language². Studies have suggested that cognitive dysfunction may occur in patients submitted to chemotherapy, mostly as adjuvant treatment for breast cancer. Vam Dam et al.³ showed cognitive dysfunction in women in the high-dose chemotherapy group and Schagen et al.⁴ reported that patients given chemotherapy present more problems with concentration and memory.

Surprisingly, few studies have taken the effects of chemotherapy on cognitive function and several methodological difficulties were seen including a lack of neuropsychological tests considering the heterogeneity of this context^{5,6,7}. Actually, we have only studies with small number of patients which do not consider confounding factors such as hormonal profile and concomitant medications, including serotonin antagonists and corticosteroids, thus it is difficult to exclude indirect mechanisms of dysfunction.

Several mechanisms have been suggested to explain the cognitive impairment associated with chemotherapy, including cytokines released from tumor tissue (interleukin 1, 2, 6, interferon, and tumour necrosis factor)¹. In animals the cytokines produced anorexia, lethargy, impairment in learning and depression⁸. Some evidences suggest that cyclophosphamide, methotrexate, and 5-Fluorouacil reduce cellular resistance to oxidative stress which can damage the blood-brain barrier and

thus allow the entry of possible neurotoxic molecules into the brain⁹. Most chemotherapeutic agents administered systemically do not cross the blood-brain barrier in significant doses; however, the amount that enters the brain can be modified by genetic variability in blood-brain barrier carriers¹⁰.

Lack of knowledge about mechanisms of action suggests the need of research addressing new animal models using different anti-cancer drugs and tests. Cyclophosphamide is an anti-cancer drug acting by DNA alkylation and widely used in chemotherapeutic protocols for patients with breast cancer^{11,12}. Recent data from animal studies suggest that very small doses of common chemotherapeutic agents can cause cell death and reduced cell division in brain structures crucial for cognition, even at doses that do not affect tumour cells¹³. In the present study we investigated cyclophosphamide in mice using behavioral procedures as inhibitory avoidance and open-field tests, such tests were validated by previous studies^{14,15,16}.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Adult male CF-1 mice (30g) were obtained from the State Foundation for Health Science Research (FEPPS/LACEN-RS, Porto Alegre, Brazil). Animals were housed five to a cage with food and water available ad libitum, and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h). All behavioral procedures were conducted between 10:00 and 16:00 h. All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care.

2.2 Drugs and pharmacological procedures

One hour prior to the behavioral procedures, animals (10-12 animals per group) were given an intraperitoneal (i.p) injection of saline or cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) dissolved in saline, in a volume of 1,0 ml/kg body weight. All drug solutions were prepared immediately before injections. Cyclophosphamide was obtained from Baxter Oncology GmbH, Halle, Germany

2.3 Behavioral procedures

The inhibitory avoidance box was a 50 x 25 x 25 cm acrylic box whose floor consisted of parallel stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7 cm wide, 2.5 cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. Animals were placed on the platform and their latency to step-down on the grid with all four paws was recorded with an automatic device. In training sessions, immediately after stepping down on the grid, the animals were given a 0.6 mA, 1.0s footshock. In two retention test sessions carried out 24 h(short-term retention) and 7 days (long-term retention) after training, no footshock was given and the step-down latency (maximum 180 s) was used as a measure of retention. The habituation task took place in a 40 X 50 cm open field surrounded by 50 cm high walls, made of plywood with a frontal glass wall. The floor was divided in 12 spaces and all animals were left to freely explore the open field for 3 minutes. The number of crossings, rearings and fecal pellets were evaluated in two test sessions carried out 24 h(short-term retention) and 7 days(long-term retention) after training.

2.4 Statistics

Data for inhibitory avoidance retention are expressed as median (interquartile ranges). Comparisons among groups were performed using a Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney U-tests when necessary. Comparison of latencies to step-down, number of crossings, rearings and defecation performed during the open-field habituation among groups were made by ANOVA. Comparisons between training and retention test performance within the same group were made

by Wilcoxon tests. In all comparisons, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3 RESULTS

Either 1 day or 1 week before behavioral training, animals were given a systemic injection of cyclophosphamide (8, 40, or 200 mg/kg, i.p.). Control animals were injected with saline. Mice treated with cyclophosphamide at 40 or 200 mg/kg 1 day prior to training showed significant impairment of 24-h memory retention when compared to control animals (Fig. 1). There was no significant difference among groups in training performance (overall mean \pm SE training trial latency-seconds was 12.77 ± 1.46 ; $p=0.16$). Systemic administration of cyclophosphamide (8, 40, or 200 mg/kg, i.p.) did not affect inhibitory avoidance memory when given 1 week before training (Fig. 2). A control experiment showed that cyclophosphamide did not affect open field behavior, indicating that the impairing effects on inhibitory avoidance could not be attributed to drug-induced alterations in locomotion, motivation, or anxiety (Fig. 3 e 4).

4 DISCUSSION

In the present study we investigated the cognitive effects of cyclophosphamide using rodent models. We have observed a transient memory impairment following cyclophosphamide administration in mice. In our experiments, male CF-1 mice (70-90 days of age) were trained and tested in step-down inhibitory avoidance conditioning, a type of emotionally motivated, hippocampus-dependent memory task where animals learn to associate a location in the training apparatus with a footshock^{17,18}. The drug did not affect inhibitory avoidance memory when given 1 week before training and mice treated with cyclophosphamide at 40 or 200 mg/kg 1 day before training showed significant impairment of 24-hour memory retention when compared with control animals.

We need to consider whether the behavioral differences between mice treated with cyclophosphamide and controls are due to drug-induced effects on performance test or cognitive dysfunction. There was no significant difference among groups in training performance after the drug injection and a control experiment showed that cyclophosphamide did not affect open field behavior, indicating that the impairing effects on inhibitory avoidance could not be attributed to drug-induced alterations in locomotion, motivation, or anxiety.

Recently, two studies evaluated cognitive function and chemotherapy in rodent models using different tests and drugs. Lee et al.⁹ showed that, using the Morris water maze and the Stone 14-unit T-maze, tasks involving multiple trials spread over several days and requiring the rat to learn and remember complex spatial relationships. Their results showed that, with 8 weeks of recovery from the chemotherapeutic regimens, rats treated with either cyclophosphamide (100 mg/kg) or 5-fluorouracil (150 mg/kg) surprisingly did significantly better than untreated

controls in both learning tasks. However, after providing even longer periods of recovery (29 to 42 weeks) they observed no significant differences in maze performances. Thus, the treatments produced a transient improvement in performance and, with longer periods of recovery, no long-term cognitive dysfunction. Winocur et al.¹⁹ presented the effects of a combination of two anti-cancer drugs, methotrexate (37.5 mg/kg) and 5-fluorouracil (75 mg/kg) on cognitive function in a mouse model. Each week for 3 consecutive weeks, mice received the combination or saline control. They observed spatial transitory deficit in the Morris water maze test occurring only on day 1 of testing. Similarly, in the test of non-matching to sample (NMTS) learning, while the drug group consistently made more errors and took longer to find the platform over the 10-day test period, the differences were quite small and, by day 8, were no longer present.

These results agree with ours showing acute rather than chronic toxicity of anti-cancer drugs, including Lee et al.⁹ that showed decreased long-term potentiation during cyclophosphamide therapy. Importantly, these results show that anti-cancer drugs can adversely affect cognitive function, apart from the confounding factors as concomitant medications and psychological changes that result from the diagnosis of cancer. Anderson-Hanley et al.²⁰ published in 2003, a meta-analysis including data from 29 studies and 838 patients, confirming that patients receiving anti-cancer drugs had cognitive impairment. Fan et al.²¹ agree with our pre-clinical data and they present the largest prospective study (206 patients) showing that cognitive dysfunction, menopausal symptoms, and fatigue are important adverse effects of chemotherapy that improve slowly over the following 2 years in most patients.

Our results show that a single administration of cyclophosphamide induces memory impairment in a mice model of aversive conditioning. Further studies are required to characterize cognitive deficits induced by cancer chemotherapy in animal

models and to investigate the mechanisms underlying the differential effects of cyclophosphamide on memory in different experimental paradigms. It is important to test other forms of chemotherapy in different models of memory evaluation and these interesting points show that animal models are useful in this setting.

REFERENCES

1. Tannock IF, Ahles TA, Ganz PA, et al. Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer: report of a workshop. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2233:2239.
2. Minisini A, Atalay G, Bottomley A, et al. What is the effect of systemic anticancer treatment on cognitive function? *The Lancet Oncology* 2004; 5: 273-282.
3. Van Dam FSAM, Schagen SB, Muller MJ, et al. Impairment of cognitive function in women receiving adjuvant treatment for high-risk breast cancer: high dose versus standard-dose chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 210-218.
4. Schagen SB, Van Dam FSAM, Muller JM, et al. Cognitive deficits after postoperative adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 640-650.
5. Wieneke MH, Dienst ER. Neuropsychological assessment of cognitive functioning following chemotherapy for breast cancer. *Psychooncology* 1995; 4: 61-66.
6. Brezden CB, Phillips KA, Abdollel M, et al. Cognitive function in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2695-2701.
7. Wefel JS, Lenzi R, Theriault RL, et al. The cognitive sequelae of standard-dose adjuvant chemotherapy in women with breast carcinoma: results of a prospective, randomized, longitudinal trial. *Cancer* 2004; 100: 2292-2299.
8. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 445-452.
9. Lee GD, Longo DL, Wang Y, et al. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 198-205.
10. Ahles TA, Saykin AJ. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. *Nature Reviews* 2007; 7: 192-201.
11. Colvin OM. *Cancer, Principles and Practice of Oncology. Antitumor Alkylating Agents-Section 3.* 6th ed 2001; 363.
12. Colvin M, Hilton J. Pharmacology of cyclophosphamide and metabolites. *Cancer Treat Rep* 1981; 3:89.
13. Dietrich J, Han R, Yang Y, et al. CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol* 2006; 5:22 (Epub ahead of print).
14. Roesler R, Luft T, Oliveira SHS, et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2006; 51: 350-357.

15. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, et al. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 2003; 24(7): 1069-1074.
16. Bianchin MM, Mello e Souza T, Medina JH, et al. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not working, short and long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 71:127-131.
17. Roesler R, Schroeder N, Vianna MR, et al. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res* 2003; 13, 975(1-2): 207-213.
18. Buckley MJ. The role of the perirhinal cortex and hippocampus in learning, memory and perception. *Q J Exp Psychol B* 2005; 58(3-4): 246-268.
19. Winocur G, Vardy J, Binns MA, et al. The effects of the anti-cancer drugs, methotrexate and 5-fluoracil, on cognitive function in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2006; 85: 66-75.
20. Anderson-Hanley C, Sherman ML, Riggs R, et al. Neuropsychological effects of treatments for adults with cancer: a meta-analysis and review of the literature. *J Int Neuropsychol Soc* 2003; 9:967-982.
21. Fan HGM, Tchen NH, Yi QL, et al. Fatigue, menopausal symptoms and cognitive function in women after adjuvant chemotherapy for breast cancer: 1 and 2 year follow-up of a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8025-8032.

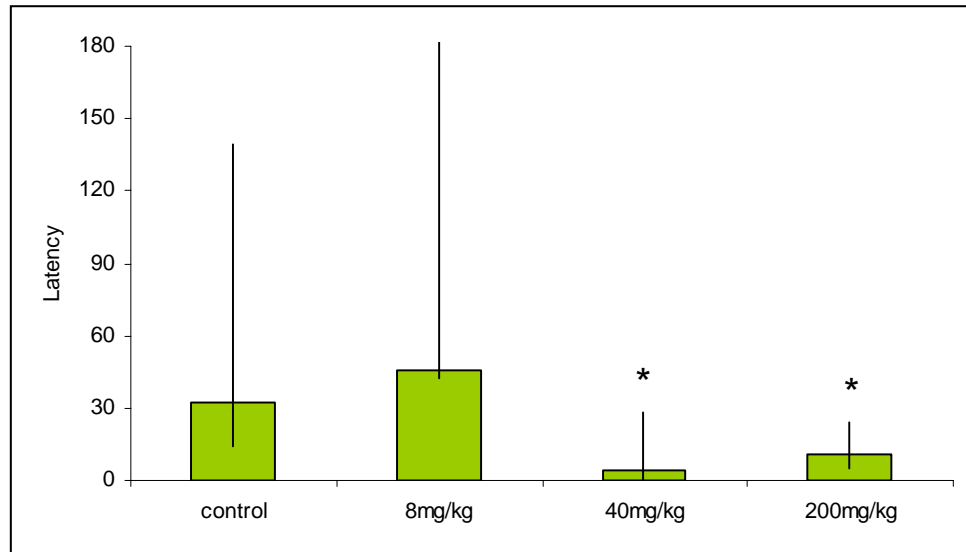


FIG. 3 - 24-h inhibitory avoidance retention in mice given an i.p. injection of saline (NaCl 0.9%) or cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) 24 h before training. Data are median (interquartile ranges) retention test step-down latencies (s). N=10-11 animals per group; $P < 0.01$ in 40 or 200 mg/kg compared to the saline-treated group.

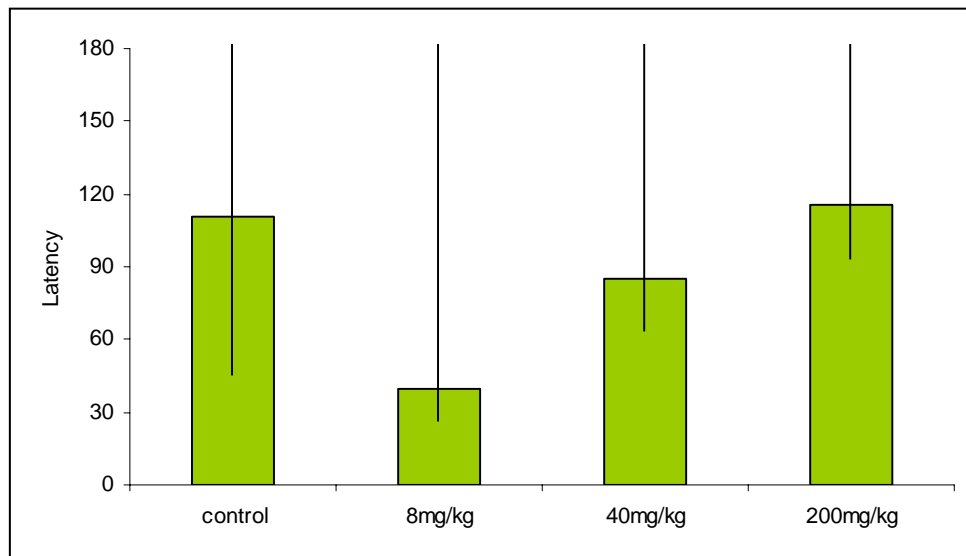
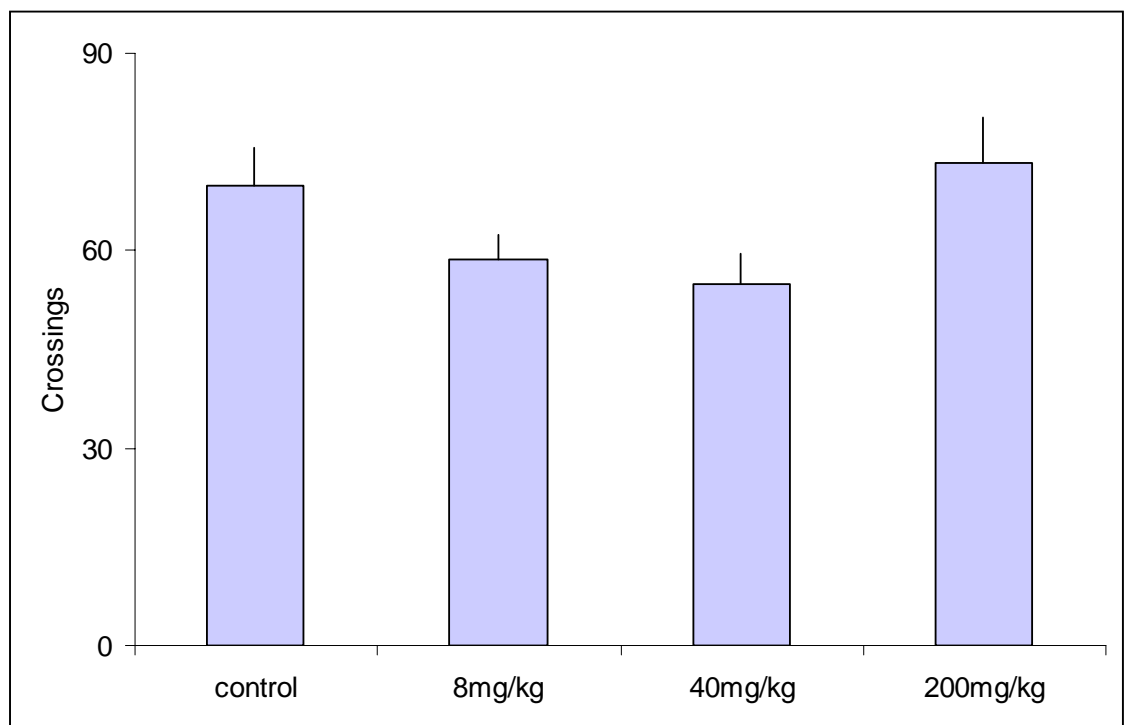
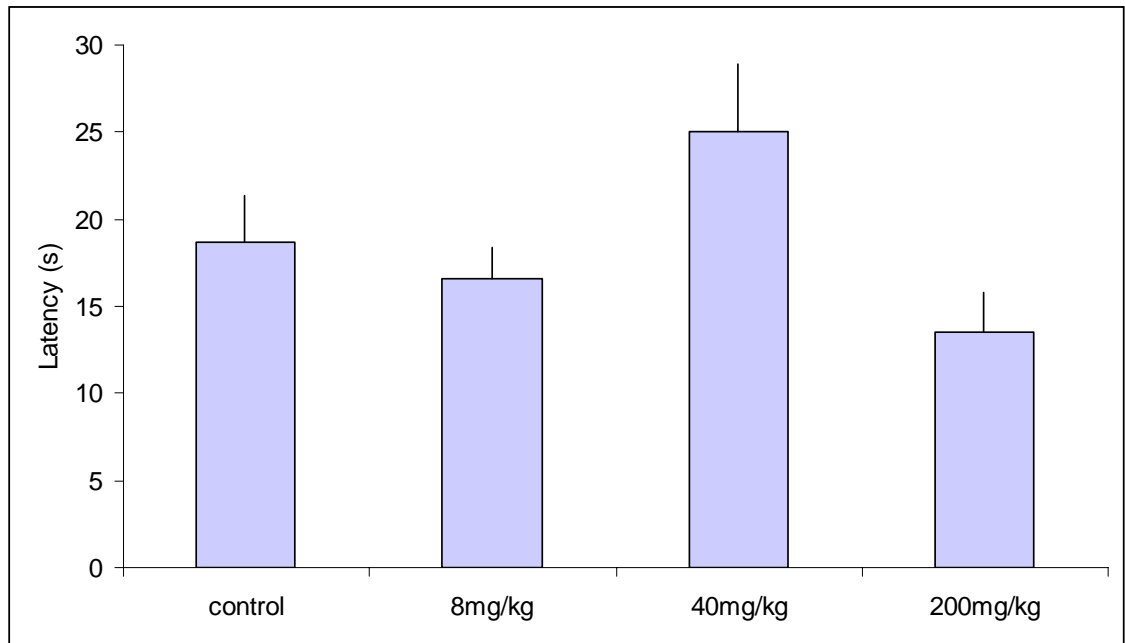


FIG. 4 - 24-h inhibitory avoidance retention in mice given an i.p. injection of saline (NaCl 0.9%) or cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) 1 week before training. Data are median (interquartile ranges) retention test step-down latencies (s). N=10-12 animals per group. There was no significant difference among groups.



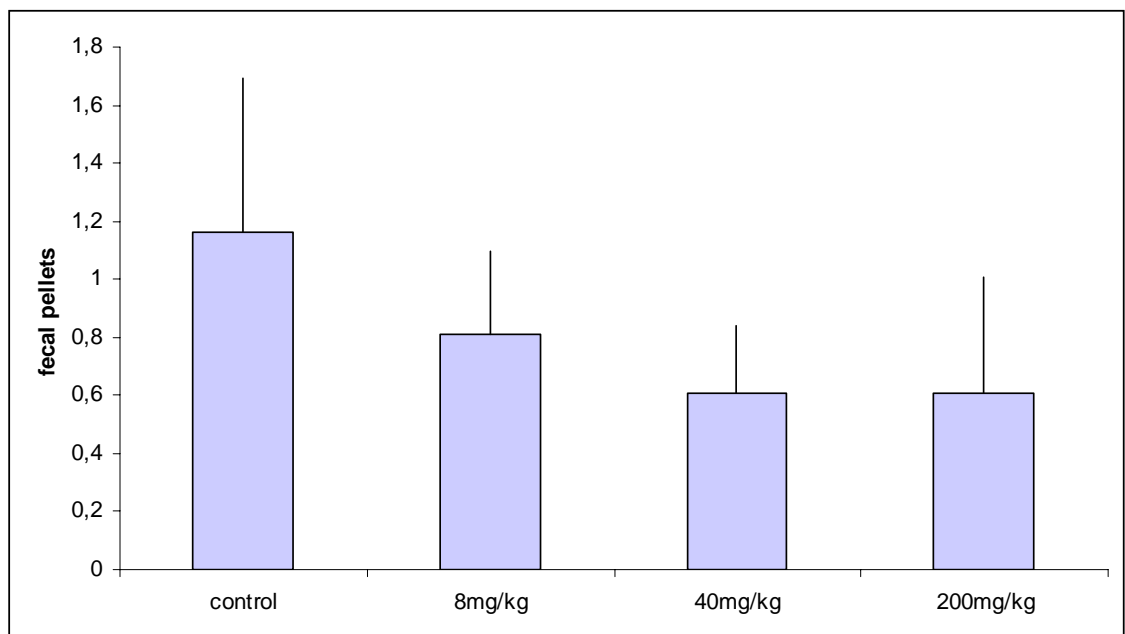
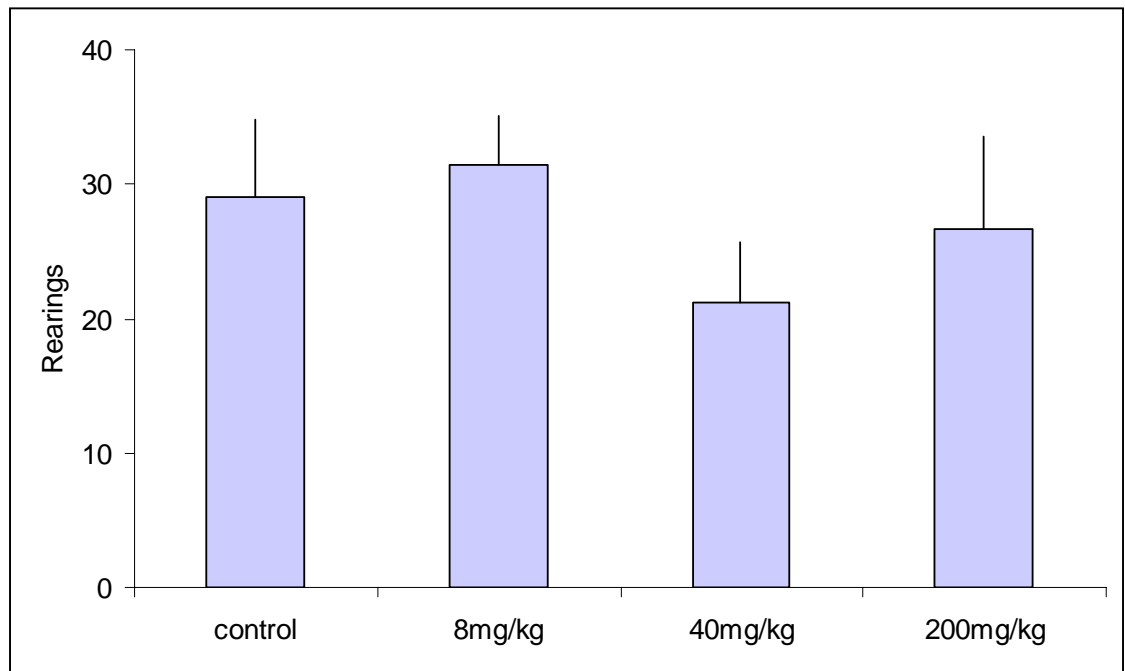
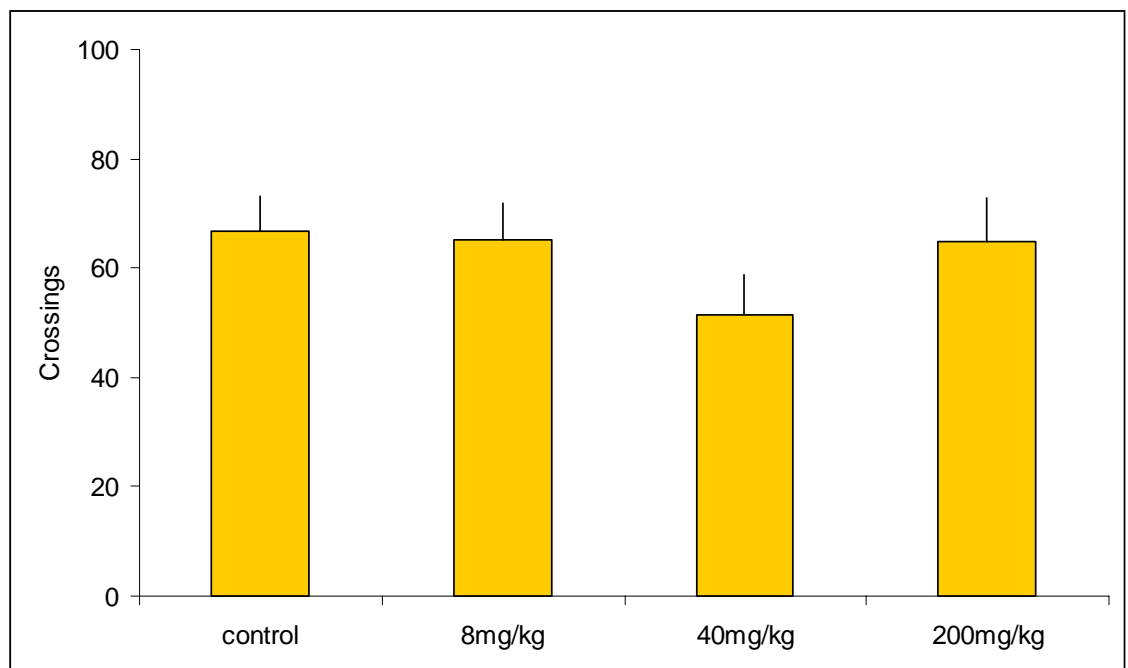
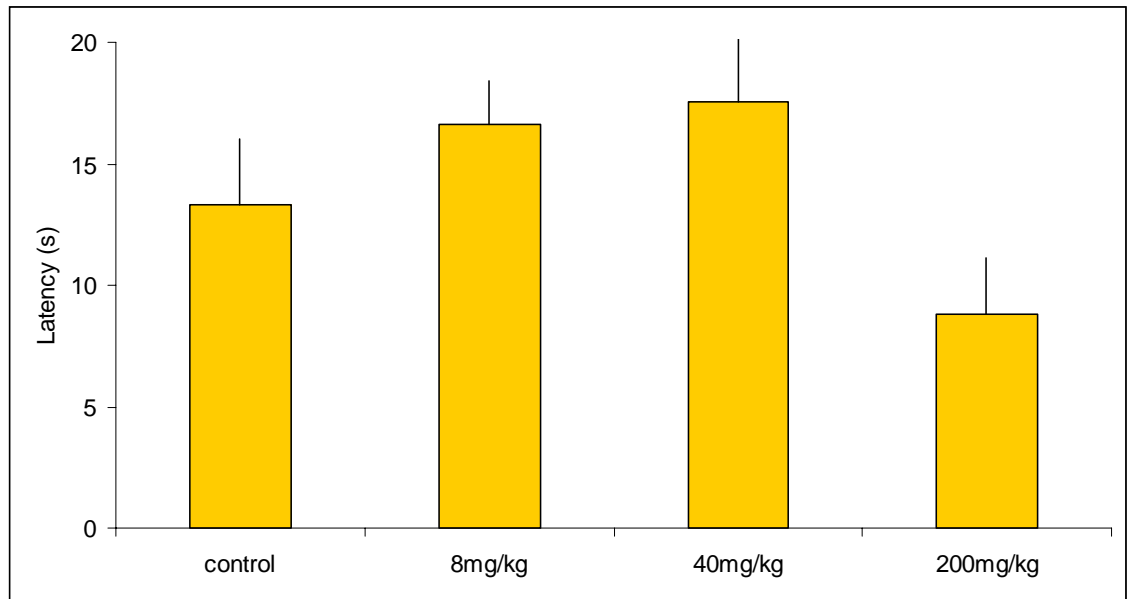
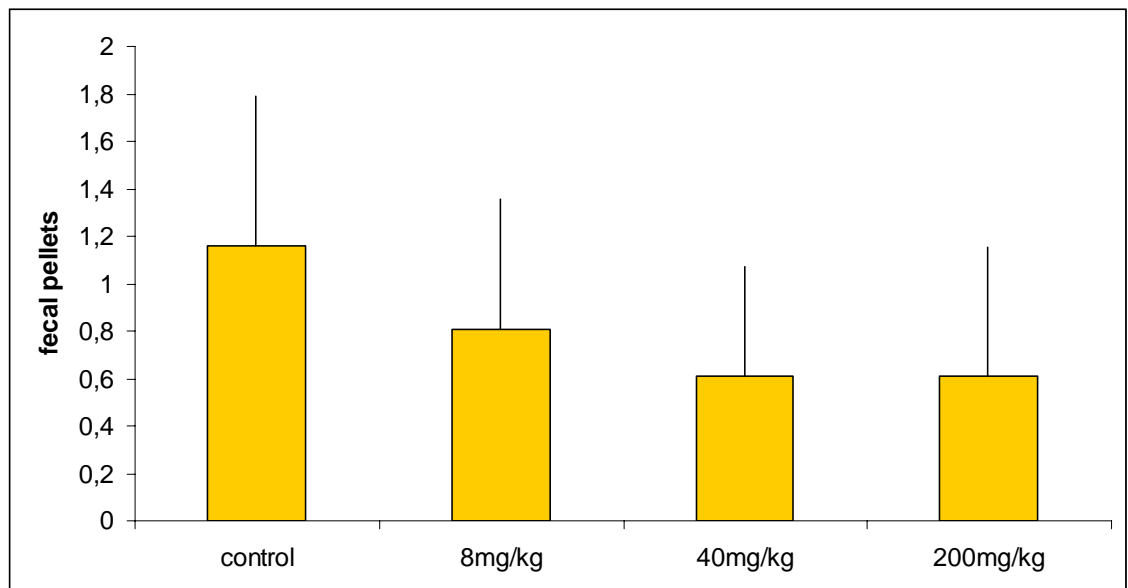
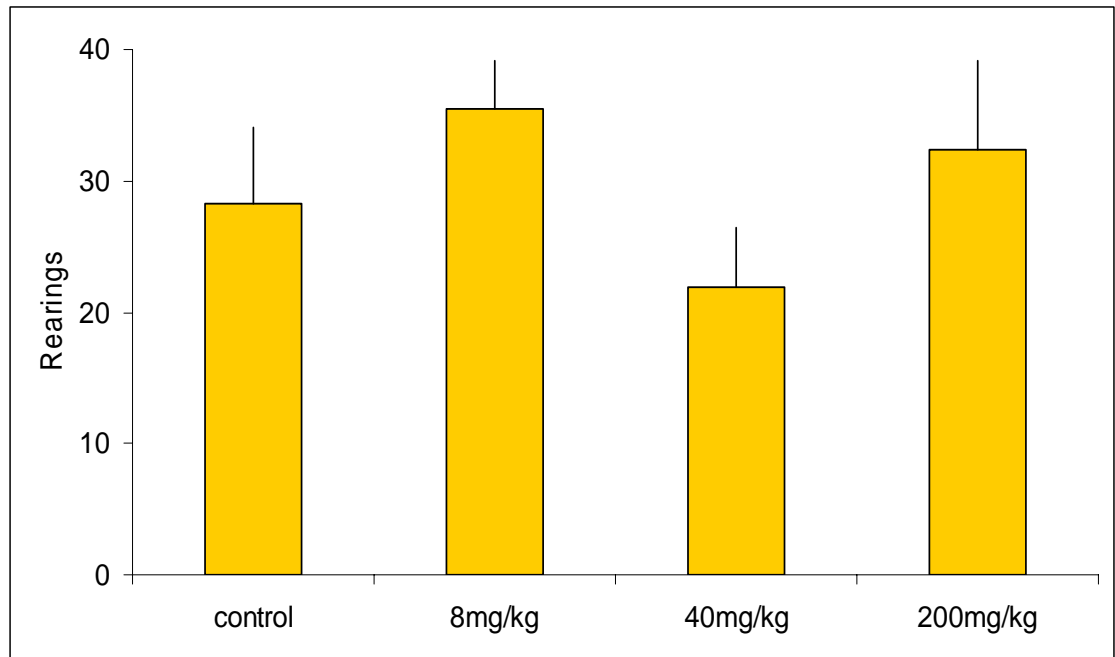


Figura 5 Open field behavior in mice given an i. p. injection of cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) or control 24 h before behavioral testing. Data are expressed as mean \pm S.E. for latency(s), number of crossings, number of rearings and number of fecal pellets. N=11-12 animals per group. There were no significant differences among groups (P values=0.075 for latencies, 0.076 for crossings, 0.177 for rearings and 0.785 for fecal pellets)





Figuras 6-Open field behavior in mice given an i. p. injection of cyclophosphamide (8, 40, 200 mg/kg) or control 1 week before behavioral testing. Data are expressed as mean \pm S.E. for latency(s), number of crossings, number of rearings and number of fecal pellets. N=11-12 animals per group. There were no significant differences among groups (P values=0.372 for latencies, 0.088 for crossings, 0.090 for rearings and 0.053 for fecal pellets)

TERCEIRA PARTE- ARTIGO 2

Cancer chemotherapy and cognitive function: Current status and perspectives

André Borba Reiriz¹, Gustavo Kellermann Reolon², Thales Preissler², João Antônio Pegas Henriques², Rafael Roesler^{2,3} and Gilberto Schwartzmann⁴

¹ Graduate Program in Medical Sciences and Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

² Center for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Preclinical Neuropharmacology Laboratory, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Department of Internal Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, and South American Office for Anticancer Drug Development, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

*Correspondence author: Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Campus Centro/UFRGS, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3316 3183, Fax: +55 51 3316 6084, E-mail: rroesler@terra.com.br

ABSTRACT

Clinical evidences have suggested that cognitive dysfunction may occur in some patients who receive chemotherapy, mostly as adjuvant treatment for breast cancer. These treatments have improved curative results and concern has shifted to chronic side-effects. Thus, we review published studies that evaluated chemotherapy and cognitive function. Most of these studies had methodological difficulties, such as lack of a validated baseline assessment and limited sample size. Further studies should include large clinical trials that use appropriate controls and prospective design. Lack of knowledge about mechanisms suggests the need of research addressing new animal models using different anti-cancer drugs and tests.

Key words: cognitive function; cyclophosphamide; mice

1 INTRODUCTION

The treatment of cancer requires multidisciplinary management, including surgery, radiotherapy and systemic approaches. These treatments have improved curative results and concern has shifted to chronic side-effects.

Several studies have suggested that cognitive dysfunction may occur in patients submitted to chemotherapy, mostly as adjuvant treatment for breast cancer. Cognitive function is commonly assessed by use of neuropsychological tests and there are inherent methodological difficulties.

Cognitive function includes skills such as: memory, attention, learning, calculation and language. Potential confounding variables are important because of the high stress on the emotional wellbeing of the patient at the diagnosis and cancer can directly affect the central nervous system.

Actually, we need a better understanding of physiopathology, developing better designed prospective clinical trials with sufficient statistical power and development of animal models integrating several anti-cancer drugs. Thus we propose to review the evidences regarding the link between chemotherapy and cognitive impairment.

2 PHYSIOPATHOLOGY

Several mechanisms have been suggested to explain cognitive impairment associated with chemotherapy, including cytokines released from tumor tissue (interleukin 1, 2, 6, interferon, and tumour necrosis factor), in animals the cytokines produced anorexia, lethargy, impairment in learning and depression¹. Meyers et al. suggested cognitive dysfunction in patients under immunotherapy². Vascular effects and induced changes in sex hormones could lead to cognitive impairment because of the damage to the endothelium of blood vessels leading to increased blood clotting³. Presence of oestrogen receptors have been described in the cerebral tissue implicating modulation of mood and cognitive function⁴. These findings are interesting because 70% of premenopausal women with early breast cancer present chemotherapy-induced amenorrhoea⁵. Similarly to oestrogens, androgens control sex-specific brain organization and influence neurotransmitters and receptors in animal models⁶.

Chemotherapy might also indirectly induce brain dysfunction through the development of anaemia, Jacobsen et al.⁷ showed a decrease in the haemoglobin levels during chemotherapy producing more problems with memory and concentration. Recombinant human erythropoietin can cross the blood-brain barrier⁸ and exert a protective action in the central nervous system⁹. Some evidences suggest that cyclophosphamide, methotrexate, and 5-Fluorouracil reduce cellular resistance to oxidative stress which can damage the blood-brain barrier and thus allow the entry of possible neurotoxic molecules into the brain¹⁰. Neurologic toxicity as encephalopathy and seizures is present with other anti-cancer drugs such as cisplatin and ifosfamide¹¹. Most chemotherapy agents administered systemically do not cross the blood-brain barrier in significant doses; however, the amount that

enters the brain can be modified by genetic variability in blood-brain barrier transporters¹². Recent data from animal studies suggest that very small doses of common chemotherapy agents can cause cell death and reduced cell division in brain structures that are crucial for cognition, even at doses that do not affect tumour cells¹³. Cyclophosphamide is present in most of breast cancer protocols administered with curative intentions, thus this drug brings special interest on the study of cognitive impact.

3 PRE-CLINICAL TRIALS

In 2003, Koolhaas described an animal model using a single high-dose of chemotherapy and abnormalities in anxiety and spatial learning were noted (data not published). Lee et al.¹⁰ showed a rat model receiving high-dose of 5-fluorouracil, cyclophosphamide or saline, 5 cycles, every 4 weeks and improvement of learning and synaptic plasticity were demonstrated. Tannock et al¹⁴ evaluated the effects of a combination de two anti-cancer drugs, metotrexate and 5-fluorouracil on cognitive function and impaired performance was demonstrated by the assess of short-term effects of the drugs.

Reiriz et al¹⁵. described acute cognitive dysfunction in rodent model receiving high-dose of cyclophosphamide. Either 1 day or 1 week before behavioral training, animals were given a systemic injection of cyclophosphamide (8, 40 or 200 mg/kg, i.p) or saline. Mice treated with cyclophosphamide at 40 or 200 mg/kg 1 day before training showed significant impairment of 24-hour memory retention when compared with control animals.

4 CLINICAL TRIALS

4.1 Breast cancer

Most of the clinical trials evaluated cognitive dysfunction in patients receiving adjuvant chemotherapy with breast cancer. Vam Dam et al.¹⁶ investigated patients with breast cancer who were classified as high risk. Patients were randomly assigned standard-dose chemotherapy or high-dose chemotherapy, followed by locoregional radiotherapy and tamoxifen. Cognitive impairment was demonstrated in 32%, 17% and 9% of patients under high-dose, conventional-dose or saline, respectively. The risk of cognitive dysfunction was significantly higher for women in the high-dose chemotherapy group ($p=0.043$, odds ratio 8.2).

Schagen et al.¹⁷ studied 39 patients with early breast cancer who had received cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil, 34 patients consisted of control group. Overall, 28% of patients in the chemotherapy group and 12% of patients in the control group were classed as having impaired cognitive function.

A study by Wienecke¹⁸ showed a impairment in a neuropsychological test in 21 of 28 patients after completion of standard-dose adjuvant chemotherapy for early breast cancer. Brezden et al.¹⁹ showed greater cognitive impairment in memory and language domains in 31 patients receiving chemotherapy.

In a small study prospective, Wefel et al.²⁰ studied 18 patients and approximately one third of patients were reported to have cognitive impairment at baseline and two thirds at the conclusion of chemotherapy. In 2005, Fan et al.²¹ published prospective data evaluating fatigue, menopausal symptoms, and cognitive dysfunction in 104 patients receiving adjuvant or neoadjuvant chemotherapy. The assessment at 1 year and 2 years showed progressive improvement of quality of life.

4.2 Other Tumors

Meyers et al.²² assessed cognitive function in patients with small-cell lung cancer, before and after chemotherapy and chest radiotherapy. No significant differences were shown between the groups. Gregor et al.²³ assessed patients in complete remission after receiving induction chemotherapy for small-cell lung cancer were randomly assigned prophylactic cranial radiotherapy or not. No evidence of cognitive worsening was shown.

Chen et al.²⁴ described a small study of 37 patients aged over 70 years with miscellaneous solid tumors and did not show any cognitive decline at the end of chemotherapy.

In 2003, Malmstrom et al.²⁵ showed that 40 patients who received primary chemotherapy for ovarian cancer showed a cognitive impairment compared with healthy women. A study evaluated cognition in 65 patients with advanced cancer showing worse performance in a memory test with goserelin treatment²⁶.

5 FINAL CONSIDERATIONS

The late complications of anti-cancer drugs have special interest including cognitive dysfunction because of the improvement in curative treatments, social limitations and impairment of multiple tasks. The number of survivors from long-term disease who are disease free is increasing rapidly among patients with early-diagnosed cancer.

Surprisingly, few studies have taken the effects of chemotherapy on cognitive function and several methodological difficulties were seen including a lack of neuropsychological tests considering the heterogeneity of this context. Actually, we have only studies with small number of patients which do not considering confounding factors such as hormonal profile and concomitant medications including serotonin antagonists and corticosteroids, therefore it is so difficult to exclude indirect mechanisms of dysfunction.

Two prospectives clinical trials were published assessing cognitive dysfunction in women with breast cancer, Wefel et al²⁰ studied 18 patients and Helen et al²¹ described 104 patients receiving chemotherapy and 102 patients in the control group. Both studies showed cognitive improvement at 1 year and 2 years of follow-up. Such results agree with pre-clinical data of our study¹⁵ and Lee et al¹⁰ who demonstrated acute cognitive impairment without late dysfunction.

However, we need to improve the data about chemotherapy and cognitive dysfunction. These perspectives include large clinical trials that use appropriate controls and prospective design. It is important to consider that many women with breast cancer have cognitive decline before the onset of their treatment. There is a need for the development of neuropsychological tests reflecting real life situations and assessing confounding factors such as anxiety, depression, hemoglobin

concentrations, status menopausal, medications and previous medical history. Lack of knowledge about mechanisms suggests the need of research addressing new animal models using different anti-cancer drugs and memory tests.

REFERENCES

1. Reichemberg A, Yirmiya R, Schuld A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 445-452.
2. Meyers CA, Abbruzzese JL. Cognitive functioning in cancer patients: effects of previous treatment. *Neurology* 1992; 42: 434-436.
3. Levine MN, Gent M, Hirsh J, et al. The thrombogenic effect of anticancer drug therapy in women with stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1988, 318: 404-407.
4. McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999; 20: 279-307.
5. Reyno LM, Levine MN, Skingley P, et al. Chemotherapy-induced amenorrhoea in a randomized trial of adjuvant chemotherapy duration in breast cancer. *Eur J Cancer* 1992; 29: 21-23.
6. Nakamura N, Fujita H, Kawata M. Effects of gonadectomy on immunoreactivity for choline acetyltransferase in the cortex, hippocampus, and basal forebrain of adult male rats. *Neurosci* 2002; 109: 473-485.
7. Jacobsen PB, Thors CL, Cawley M, et al. Relation of decline in hemoglobin to cognitive functioning and fatigue during chemotherapy treatment. *Proc ASCO* 2002; 21: 386(abstr).
8. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10526-10531.
9. Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA : oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000; 30: 271-278.
10. Lee GD, Longo DL, Wang Y, et al. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 198-205.
11. Minisini A, Atalay G, Bottomley A, et al. What is the effect of systemic anticancer treatment on cognitive function? *The Lancet Oncology* 2004; 5: 273-282.
12. Ahles TA, Saykin AJ. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. *Nature Reviews* 2007; 7: 192-201.
13. Dietrich J, Han R, Yang Y, et al. CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol* 2006; 5:22 (Epub ahead of print).

14. Tannock IF, Ahles TA, Ganz PA, et al. Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer: report of a workshop. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2233-2239.
15. Reiriz AB, Roesler R, Schwartzmann G, et al. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5000-5001.
16. Van Dam FSAM, Schagen SB, Muller MJ, et al. Impairment of cognitive function in women receiving adjuvant treatment for high-risk breast cancer: high dose versus standard-dose chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 210-218.
17. Schagen SB, Van Dam FSAM, Muller JM, et al. Cognitive deficits after postoperative adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 640-650.
18. Wieneke MH, Dienst ER. Neuropsychological assessment of cognitive functioning following chemotherapy for breast cancer. *Psychooncology* 1995; 4: 61-66.
19. Brezden CB, Phillips KA, Abdollel M, et al. Cognitive function in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2695-2701.
20. Wefel JS, Lenzi R, Theriault RL, et al. The cognitive sequelae of standard-dose adjuvant chemotherapy in women with breast carcinoma: results of a prospective, randomized, longitudinal trial. *Cancer* 2004; 100: 2292-2299.
21. Fan HGM, Tchen NH, Yi QL, et al. Fatigue, menopausal symptoms and cognitive function in women after adjuvant chemotherapy for breast cancer: 1 and 2 year follow-up of a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8025-8032.
22. Meyers CA, Byrne KS, Komaki R. Cognitive deficits in patients with small-cell lung cancer before and after chemotherapy. *Lung Cancer* 1995; 12:231-235.
23. Gregor A, Cull A, Stephens RJ, et al. Prophylactic cranial irradiation is indicated following complete response to induction therapy in small-cell lung cancer: results of a multicentre randomised trial. *Eur J Cancer* 1997;33:1752-1758.
24. Chen H, Cantor A, Meyer J, et al. Can older patients tolerate chemotherapy? A prospective pilot study. *Cancer* 2003; 97: 1107-1114.
25. Malmstrom H. Cognitive functions in patients with ovarian cancer receiving chemotherapy. *Proc ASCO* 2003;22:462.
26. Green HJ, Pakenham KI, Headley BC, et al. Altered cognitive function in men treated for prostate cancer with LHRH analogues and cyproterone acetate: a randomized controlled trial. *BJU Int* 2002; 90: 427-432.

**QUARTA PARTE – ARTIGO 1 -
TRADUÇÃO PARA LÍNGUA PORTUGUESA**

QUIMIOTERAPIA E FUNÇÃO COGNITIVA EM MODELO DE ROEDORES: DANO DE MEMÓRIA INDUZIDO PELA CICLOFOSFAMIDA EM CAMUNDONGOS

André Borba Reiriz¹, Gustavo Kellermann Reolon², Thales Preissler²,
Joémerson Osório Rosado², João Antônio Pegas Henriques², Rafael Roesler^{2,3} and
Gilberto Schwartzmann⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

² Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

³ Laboratório de Neurofarmacologia Pré-clínica, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brasil

⁴ Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fundação Sul-Americana para Desenvolvimento de Novas Drogas Anti-Câncer, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

*Correspondência para o autor: Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Campus Centro/UFRGS, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3316 3183, Fax: +55 51 3316 6084, E-mail: rroesler@terra.com.br

RESUMO

Estudos têm sugerido que a disfunção cognitiva pode ocorrer em pacientes sob tratamento quimioterápico, principalmente no cenário de tratamento adjuvante do câncer de mama. Esses estudos têm avaliado os efeitos da quimioterapia na função cognitiva e diversas dificuldades metodológicas têm sido percebidas, desse modo a carência de conhecimento a respeito dos possíveis mecanismos desse dano, torna importante o desenvolvimento de novos modelos animais, utilizando diferentes testes e agentes anticâncer. Em nossos experimentos, camundongos machos receberam uma injeção sistêmica de ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg) ou solução salina como controle. Os animais foram treinados e após 1 dia e 7 dias da injeção de ciclofosfamida eram testados em avaliação de esQUIVA inibitória e de habituação em campo aberto. Camundongos, tratados com ciclofosfamida na dose de 40 ou 200 mg/kg, demonstraram um dano na memória de retenção em 24 horas. Assim, esses resultados sugerem disfunção cognitiva aguda e o experimento controle de habituação ao campo aberto não demonstrou diferenças significativas. Desse modo, indicaram que o dano cognitivo não pode ser atribuído a alterações em locomoção, em motivação ou em ansiedade. Estudos futuros são necessários para melhor caracterizarem os danos cognitivos induzidos pela quimioterapia em modelos animais e assim determinarem os mecanismos responsáveis pelos diferentes efeitos da ciclofosfamida em memória, nos distintos experimentos.

Palavras-chave: função cognitiva; ciclofosfamida; camundongos

1 INTRODUÇÃO

A melhora dos resultados curativos tem tornado as complicações tardias razão de especial interesse, com destaque para a disfunção cognitiva que impõe limitações sociais e dificuldade na execução de múltiplas tarefas¹. O número de sobreviventes livres de doença tem aumentado rapidamente em pacientes com neoplasias malignas de diagnóstico precoce.

A função cognitiva inclui habilidades como memória, atenção, aprendizado, cálculo e linguagem². Alguns estudos têm sugerido que a disfunção cognitiva pode ocorrer em pacientes sob tratamento quimioterápico, especialmente na terapia adjuvante ao câncer de mama. Vam Dam e cols.³ demonstraram disfunção cognitiva em mulheres sob alta dose de quimioterapia e Schagen e cols.⁴ relataram que os pacientes recebendo quimioterapia apresentavam mais problemas relacionados à memória e à concentração.

Surpreendentemente, poucos estudos têm avaliado os efeitos da quimioterapia na função cognitiva e diversas dificuldades metodológicas são vistas, incluindo a ausência de testes neuropsicológicos que considerem a heterogeneidade do contexto^{5,6,7}. Na verdade, nós temos estudos com pequeno número de pacientes, não considerando fatores de confusão como perfil hormonal, medicações concomitantes, como por exemplo os corticoesteróides e os antagonistas de receptores da serotonina, sendo complexa a exclusão de mecanismos indiretos de disfunção.

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar o dano cognitivo relacionado à quimioterapia, incluindo a liberação de citocinas do tecido tumoral (interleucina 1, 2, 6, interferon e fator de necrose tumoral)¹. Em animais, as citocinas produziram anorexia, letargia, dificuldade de aprendizado e depressão⁸.

Algumas evidências consideram que a ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil reduziriam a resistência celular ao estresse oxidativo, causando dano na barreira hemato-encefálica e, desse modo, permitindo a entrada de moléculas neurotóxicas no cérebro⁹. A maioria dos agentes quimioterápicos administrados sistemicamente não atravessa a barreira hemato-encefálica em doses significantes, porém a penetração no encéfalo pode ser modificada pela variabilidade genética nos transportadores da barreira hemato-encefálica¹⁰.

A carência de conhecimento sobre mecanismos de fisiopatologia reforça a necessidade de desenvolver novos modelos animais, utilizando diferentes agentes anticâncer e testes. Ciclofosfamida é um agente quimioterápico que age como um agente alquilante do DNA, sendo largamente utilizado nos diversos protocolos de pacientes com câncer de mama^{11,12}. Dados oriundos de estudos em animais sugerem que doses muito pequenas de quimioterápicos freqüentemente utilizados, podem causar morte celular e reduzida divisão celular em estruturas cerebrais cruciais para cognição, mesmo com doses que não produzam efetiva morte de células neoplásicas¹³. No presente estudo é proposta a avaliação da ciclofosfamida em camundongos, a fim de definir possível dano cognitivo, utilizando procedimentos comportamentais como a esquiva inibitória e a habituação ao campo aberto, testes validados em estudos prévios^{14,15,16}.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais experimentais

Serão utilizados camundongos CF-1 machos adultos (30 g) obtidos da Fundação Estadual de Pesquisa em Saúde (FEPPS/LACEN,RS). Esses animais serão mantidos em grupos de cinco por caixa, com ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e comida disponíveis *ad libitum*. Os procedimentos comportamentais foram realizados entre 10:00 e 16:00. Todos os procedimentos envolvendo animais serão realizados de acordo com NIH Guide for the care and Use of Laboratory Animals e as recomendações de cuidado animal da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

2.2 Drogas e procedimentos farmacológicos

Uma hora antes do procedimento comportamental, os animais(10-12 por grupo) receberam injeção intraperitoneal de solução salina ou ciclofosfamida (8, 40 e 200 mg/kg) diluída em veículo salino, em um volume de 1 ml/kg. Todas soluções foram preparadas imediatamente antes das injeções. Ciclofosfamida foi obtida de Baxter Oncology GmbH, Halle, Alemanha.

2.3 Procedimentos neurocomportamentais

O aparato de treino em esquivas inibitórias consiste de uma caixa de acrílico de 50 x 25 x 25 cm (Albarsch) com uma grade de barras de aço paralelas de 1 mm de

diâmetro. Uma plataforma de 7 cm de largura e 2.5 cm de altura será colocada junto a parede esquerda da caixa. Na sessão de treino, os animais serão colocados na plataforma e sua latência de descida para o assoalho será medida com um dispositivo automático. Após descerem da plataforma e colocarem as quatro patas no assoalho, esses animais recebem 0.6 mA em 1.0 s. Em sessões de teste, realizadas 24 h e uma semana após o treino, eles serão recolocados na plataforma e suas latências de descida serão registradas e usadas como uma medida de retenção (memória) da tarefa.

Na tarefa de habituação ao campo aberto, esses animais serão colocados no canto esquerdo de uma caixa de madeira (40 x 40 x 50 cm) cujo assoalho é dividido em 12 quadrados iguais por linhas pretas. Durante a sessão de treino, os animais explorarão a caixa livremente e será registrado o número de cruzamentos, evacuações e o número de respostas de orientação (*rearings*). Na sessão de teste, 24 h e sete dias após o treino, eles serão recolocados na caixa e esses parâmetros comportamentais serão novamente registrados.

2.4 Análise estatística

Os dados de esquiva inibitória e de habituação ao campo aberto serão expressos como média + erro padrão ou como mediana (intervalos interquartis). Nos casos de utilização de estatística não paramétrica, diferenças entre os grupos serão verificadas com a análise de variância de Kruskal-Wallis e testes de Mann-Whitney. Comparações entre treino e teste de retenção, dentro do mesmo grupo serão feitas com testes de Wilcoxon. Comparações de latências para descida, cruzamentos, *rearings* e defecações serão feitas com análises de variância de uma

via (ANOVA), seguidas de testes *post-hoc* adequados. Em todas as comparações, valores de P menores que 0,05 indicarão diferenças significativas.

3 RESULTADOS

Uma aplicação sistêmica por via intraperitoneal, de ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg), foi realizada 1 dia ou 7 dias antes dos testes. Os animais controles foram injetados com solução salina. Camundongos tratados com ciclofosfamida nas doses de 40 ou 200 mg/kg, 1 dia prévio ao teste demonstraram significativo dano da memória de retenção em 24 h quando comparados aos animais controle, utilizando teste U de Mann-Whitney (Fig. 1). Não houve significativas diferenças entre grupos no desempenho de treino ($P= 0.16$, média global \pm erro padrão na latência em treino (seg) foi 12.77 ± 1.46). A administração sistêmica de ciclofosfamida (8,40 ou 200 mg/kg, i.p) não afetou a memória de esQUIVA inibitória quando testada uma semana após (Fig. 2). O experimento controle mostrou que a ciclofosfamida não afetou o comportamento em campo aberto, assim não permitindo atribuir a disfunção cognitiva a alterações em locomoção, ansiedade e motivação (Fig 3 e 4).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos cognitivos da ciclofosfamida, utilizando um modelo de roedores. Foi observado um déficit transitório de memória seguindo a administração de ciclofosfamida em camundongos. Em nossos experimentos, camundongos CF-1 machos (70-90 dias de idade) foram treinados e testados em avaliação de esquiva inibitória, uma tarefa relacionada à memória hipocampo-dependente, emocionalmente motivada, onde animais aprendem a relacionar uma localização com o choque elétrico em suas patas, durante o aparato de treino^{17,18}. A droga não afetou a memória avaliada por esquiva inibitória quando o teste foi realizado 1 semana após a injeção, enquanto camundongos tratados com ciclofosfamida na dose de 40 ou 200 mg/kg, 1 dia antes do teste, mostraram significativa deterioração na retenção de memória em 24 h em comparação com os animais controle.

Porém, é necessário considerar se as diferenças comportamentais entre camundongos tratados com ciclofosfamida e grupo controle são originadas por efeitos induzidos pela droga durante a performance no teste ou por disfunção cognitiva. Não houve diferenças significativas entre os grupos no treino após injeção da droga e também não foram verificadas diferenças no comportamento em campo aberto, indicando, assim, que o déficit demonstrado em esquiva inibitória não poderia ser atribuído a alterações em locomoção, motivação ou ansiedade.

Recentemente 2 estudos avaliaram função cognitiva e quimioterapia em modelos de roedores, utilizando diferentes testes e drogas. Lee e cols.⁹ testaram a função cognitiva utilizando o labirinto Morris water e o labirinto Stone 14-unit T, tarefas envolvendo múltiplos testes ao longo de vários dias e que requerem aos ratos o aprendizado e a lembrança de complexas relações espaciais. Seus

resultados mostraram que, após 8 semanas de recuperação do tratamento quimioterápico, ratos tratados seja com ciclofosfamida (100 mg/kg) ou com 5-fluorouracil (150 mg/kg), surpreendentemente apresentaram melhor performance que os controles, em ambas tarefas. Entretanto, após períodos mais longos de recuperação, 29 a 42 semanas, não foram observadas diferenças nas performances de labirinto. Assim, os tratamentos produziram uma transitória deterioração cognitiva e com avaliação mais tardia não foi verificada disfunção cognitiva. Winocur e cols.¹⁹ apresentaram os efeitos de uma combinação de agentes anticâncer, metotrexate (37.5 mg/kg) e 5-fluorouracil (75 mg/kg), na função cognitiva, em modelo de camundongos. Foram ofertadas doses semanais, por 3 semanas, recebendo a combinação ou o controle salino. Eles observaram déficit transitório espacial no labirinto Morris water, ocorrendo somente no dia 1 de teste. De forma semelhante, no teste non-matching to sample (NMTS) learning, o grupo sob quimioterapia cometeu mais erros e gastou mais tempo para encontrar a plataforma durante o período de 10 dias de teste, porém as diferenças foram sutis e no dia 8 não estavam mais presentes.

Esses resultados são concordantes com nosso estudo, mostrando dano agudo cognitivo, sem evidência tardia de tal toxicidade, incluindo Lee e cols.⁹ que mostraram diminuída potenciação de longo prazo durante terapia com ciclofosfamida. Significativamente, esses resultados demonstram que drogas anticâncer podem trazer dano à função cognitiva, a despeito de fatores de confusão, como medicações concomitantes e mudanças psicológicas que resultam do diagnóstico de câncer. Andreson-Hanley e cols.²⁰ publicaram em 2003, uma meta-análise incluindo dados de 29 estudos e 838 pacientes, demonstrando que pacientes recebendo tratamento quimioterápico apresentavam disfunção cognitiva. Fan e cols.²¹ são concordantes com nossos dados pré-clínicos e apresentaram o maior

estudo clínico prospectivo (206 pacientes), mostrando que disfunção cognitiva, sintomas de menopausa e fadiga são importantes efeitos adversos da quimioterapia e regridem lentamente ao longo dos 2 anos seguintes na maioria dos pacientes.

Nossos resultados mostram que uma aplicação única de ciclofosfamida induz dano de memória em modelo de camundongos sob condicionamento aversivo. Novos estudos no futuro são necessários para caracterizar déficits cognitivos induzidos pela quimioterapia anticâncer, utilizando modelos animais e assim investigando os mecanismos que caracterizam os diferentes efeitos da ciclofosfamida na memória, nos diferentes paradigmas experimentais. Portanto, é mister testar outras formas de quimioterapia, nos diferentes modelos de avaliação de memória, e , dessa forma, salientamos o importante papel dos modelos animais na busca de respostas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tannock IF, Ahles TA, Ganz PA, et al. Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer : report of a workshop. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2233-2239.
2. Minisini A, Atalay G, Bottomley A, et al. What is the effect of systemic anticancer treatment on cognitive function? *The Lancet Oncology* 2004; 5: 273-282.
3. Van Dam FSAM, Schagen SB, Muller MJ, et al. Impairment of cognitive function in women receiving adjuvant treatment for high-risk breast cancer: high dose versus standard-dose chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 210-218.
4. Schagen SB, Van Dam FSAM, Muller JM, et al. Cognitive deficits after postoperative adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 640-650.
5. Wieneke MH, Dienst ER. Neuropsychological assessment of cognitive functioning following chemotherapy for breast cancer. *Psychooncology* 1995; 4: 61-66.
6. Brezden CB, Phillips KA, Abdollel M, et al. Cognitive function in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2695-2701.
7. Wefel JS, Lenzi R, Theriault RL, et al. The cognitive sequelae of standard-dose adjuvant chemotherapy in women with breast carcinoma: results of a prospective, randomized, longitudinal trial. *Cancer* 2004; 100: 2292-2299.
8. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 445-452.
9. Lee GD, Longo DL, Wang Y, et al. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 198-205.
10. Ahles TA, Saykin AJ. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. *Nature Reviews* 2007; 7: 192-201.
11. Colvin OM. *Cancer, Principles and Practice of Oncology. Antitumor Alkylating Agents-Section 3.* 6th ed 2001; 363.
12. Colvin M, Hilton J. Pharmacology of cyclophosphamide and metabolites. *Cancer Treat Rep* 1981; 3:89.
13. Dietrich J, Han R, Yang Y, et al. CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol* 2006; 5:22 (Epub ahead of print).

14. Roesler R, Luft T, Oliveira SHS, et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2006; 51: 350-357.
15. Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, et al. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides* 2003; 24(7): 1069-1074.
16. Bianchin MM, Mello e Souza T, Medina JH, et al. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not working, short and long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 1999; 71:127-131.
17. Roesler R, Schroeder N, Vianna MR, et al. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res* 2003; 13, 975(1-2): 207-213.
18. Buckley MJ. The role of the perirhinal cortex and hippocampus in learning, memory and perception. *Q J Exp Psychol B* 2005; 58(3-4): 246-268.
19. Winocur G, Vardy J, Binns MA, et al. The effects of the anti-cancer drugs, methotrexate and 5-fluoracil, on cognitive function in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2006; 85: 66-75.
20. Anderson-Hanley C, Sherman ML, Riggs R, et al. Neuropsychological effects of treatments for adults with cancer: a meta-analysis and review of the literature. *J Int Neuropsychol Soc* 2003; 9:967-982.
21. Fan HGM, Tchen NH, Yi QL, et al. Fatigue, menopausal symptoms and cognitive function in women after adjuvant chemotherapy for breast cancer: 1 and 2 year follow-up of a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8025-8032.

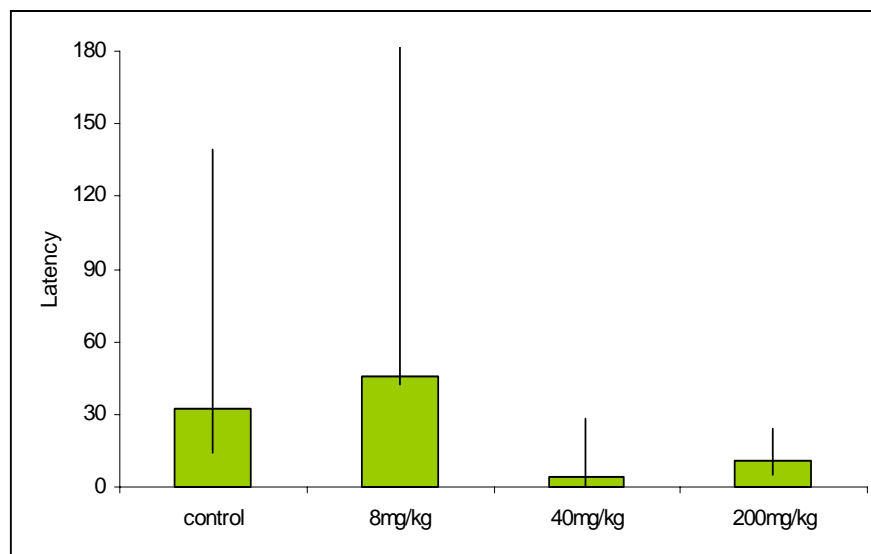


FIG. 7 - Infusão intra-peritoneal de solução salina (NaCl 0.9%) ou ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg) em camundongos, 24 horas antes do teste. Os dados são medianas (intervalos interquartis) das latências para descida no teste de retenção em tarefa de esquiva inibitória (s). N=10-11 animais por grupo; *P<0.01 em 40 ou 200 mg/kg comparado ao grupo tratado com salina.

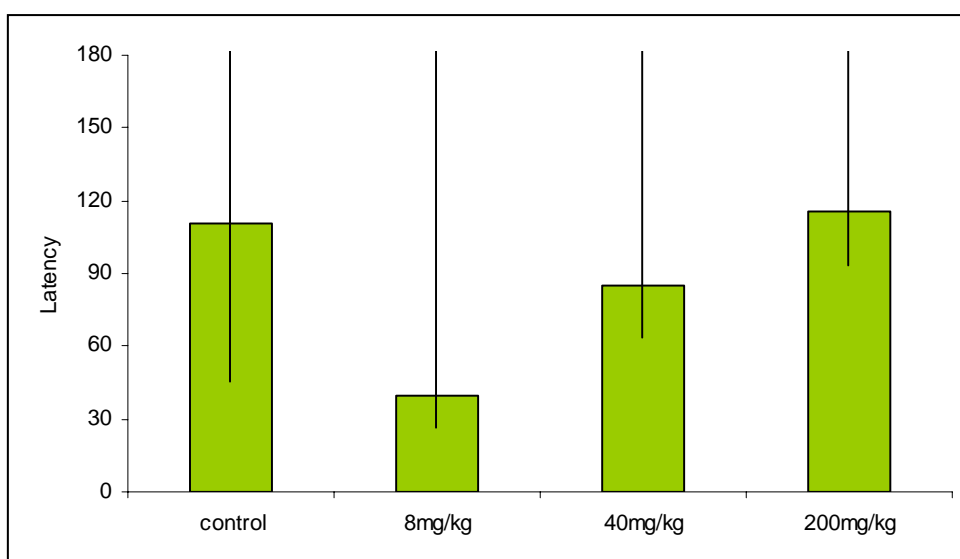
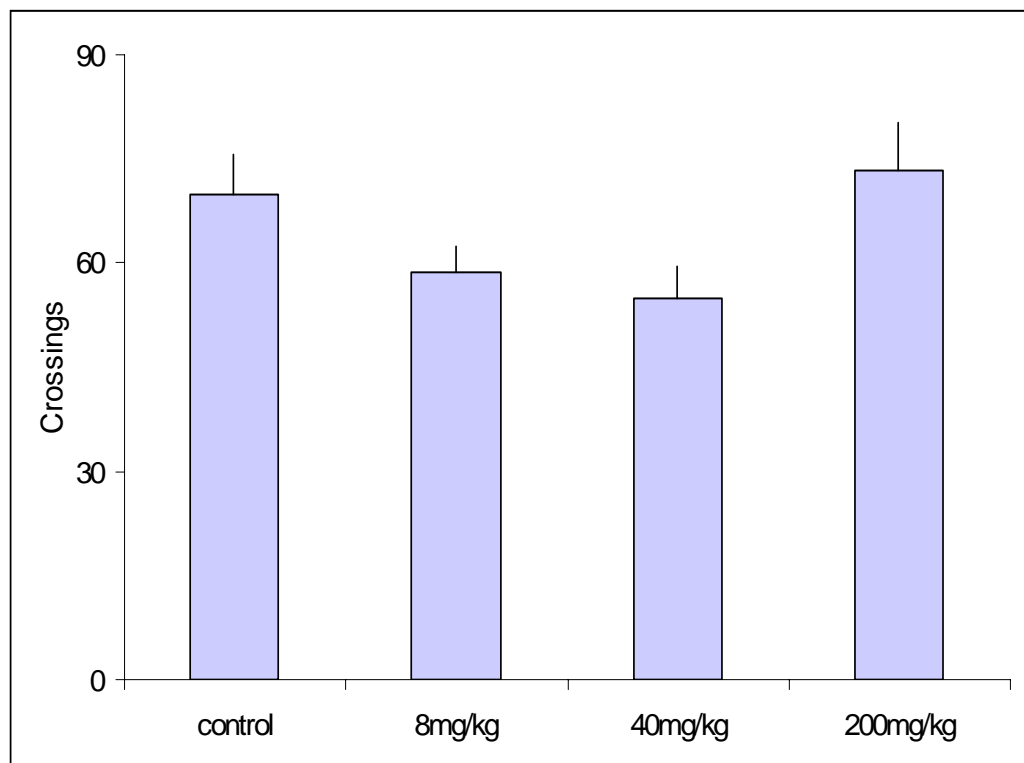
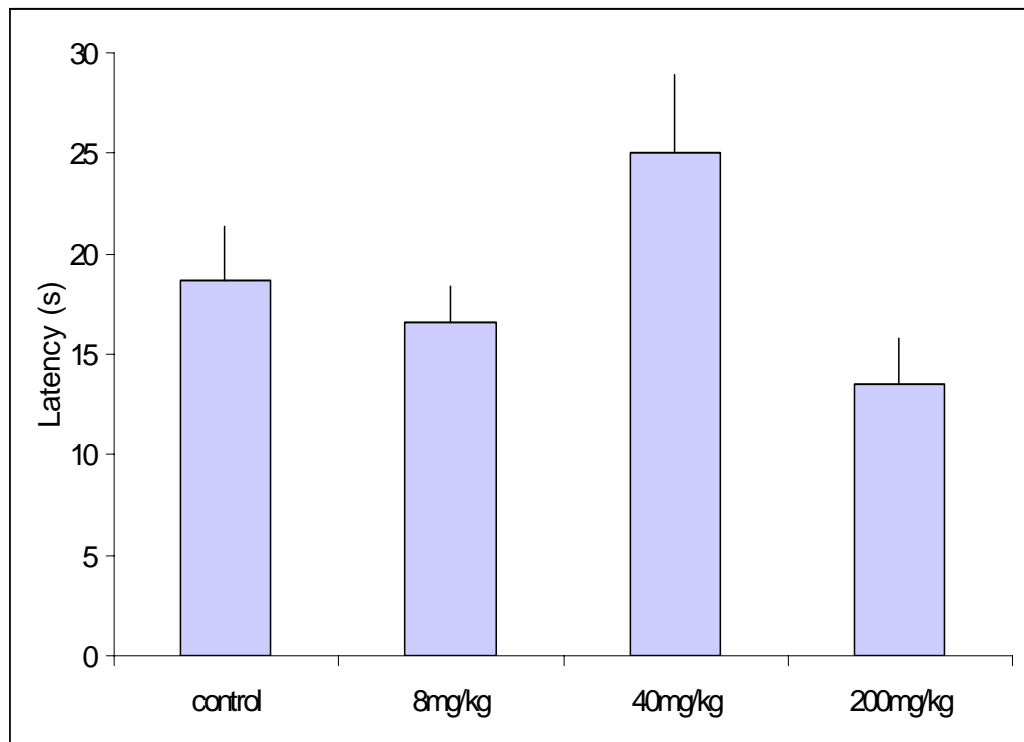


FIG. 8 - Infusão intra-peritoneal de solução salina (NaCl 0.9%) ou ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg) em camundongos, 1 semana antes do teste. Os dados são medianas (intervalos interquartis) das latências para descida no teste de retenção em tarefa de esquiva inibitória (s). N=10-12 animais por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos.



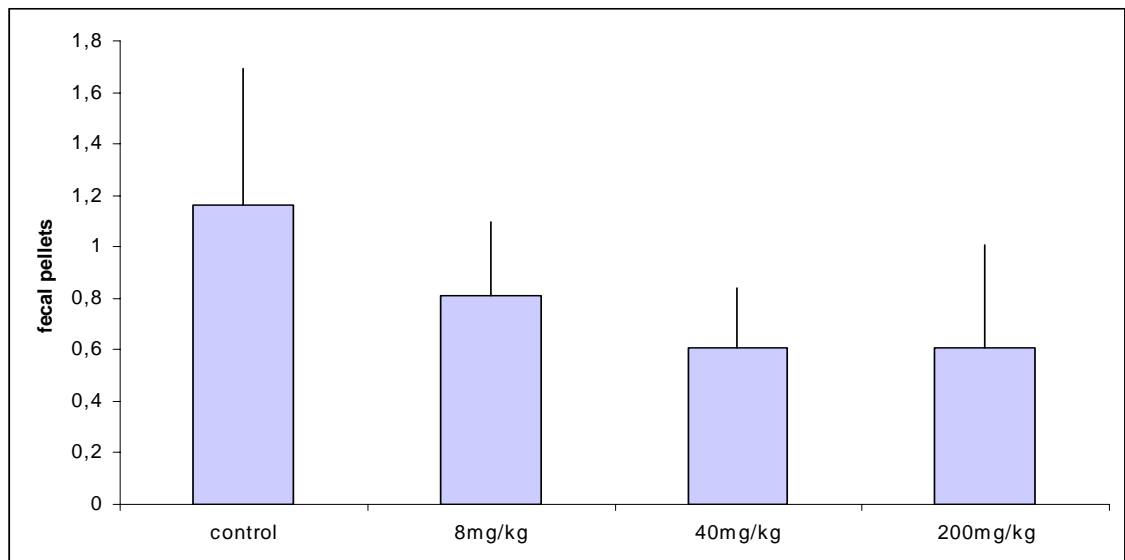
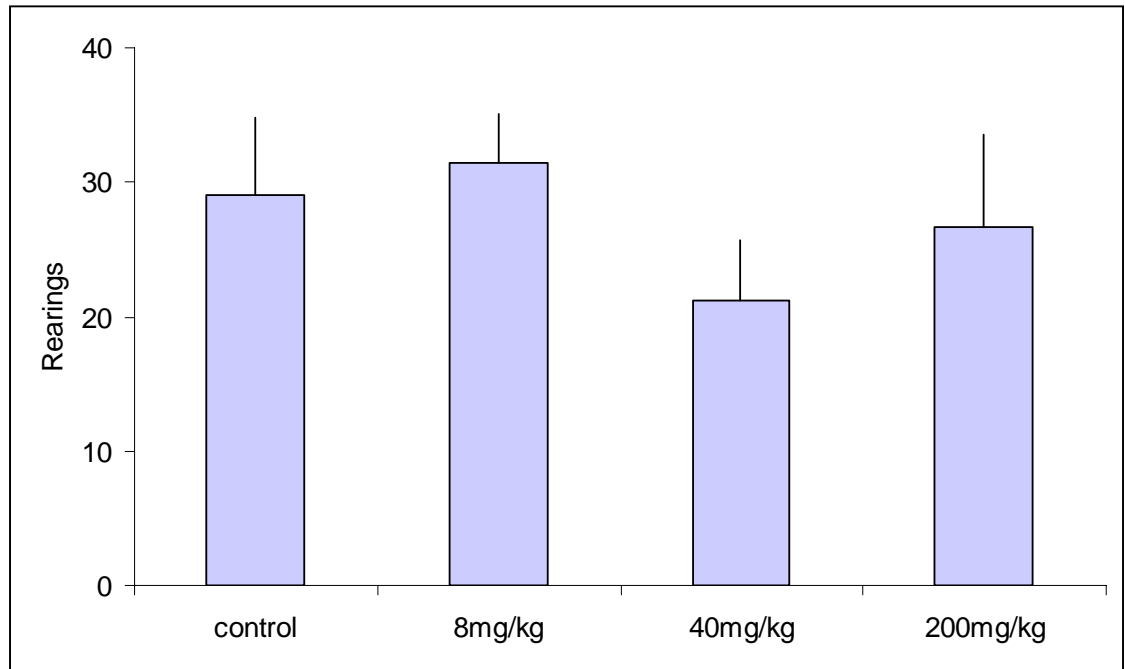
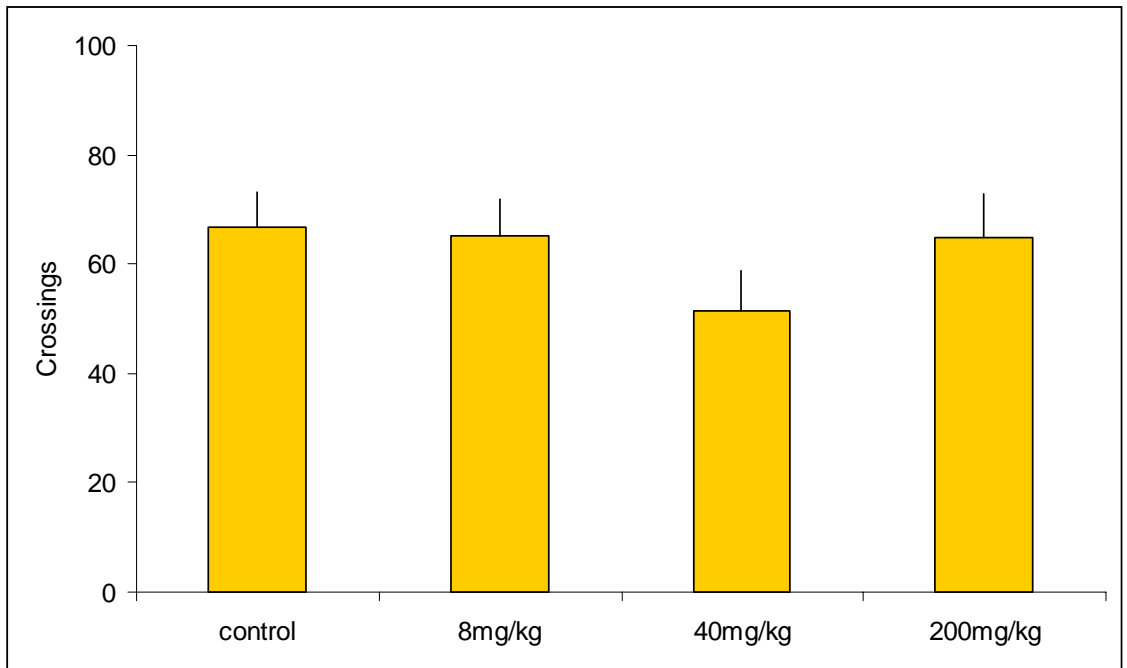
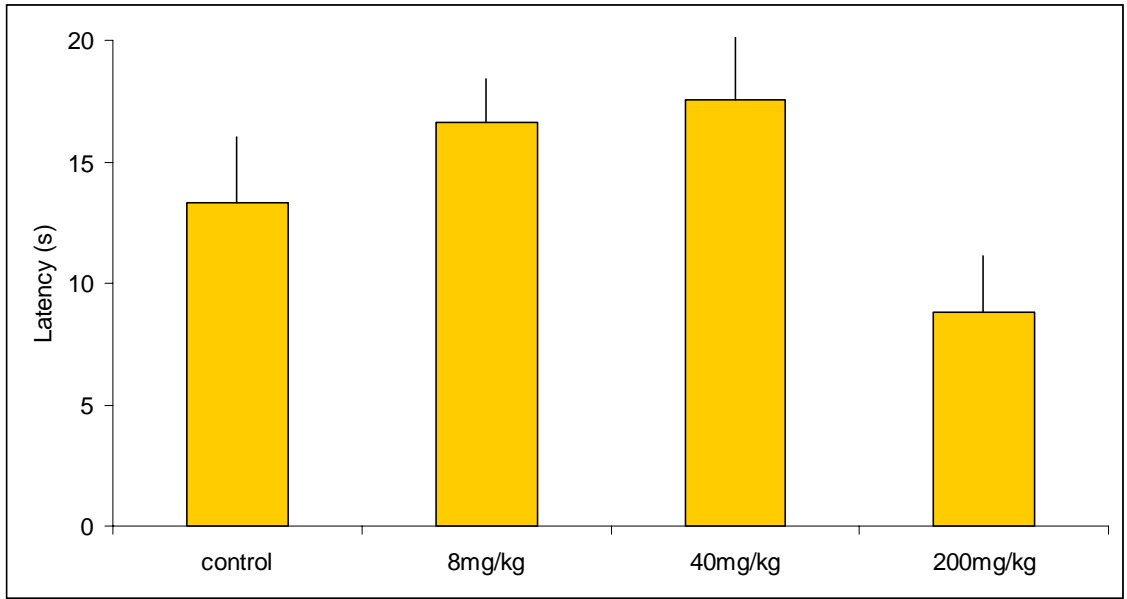


Fig. 9- Habituação em campo aberto com camundongos recebendo injeção intra-peritoneal de ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg) ou controle salino, 24 h antes do teste comportamental. Os dados são expressos como média \pm erro padrão para latência(s), número de cruzamentos, número de rearings e número de defecações. N=11-12 animais por grupo. Não houve diferenças significativas entre grupos ($P=0.075$ para latências, 0.076 para cruzamentos, 0.177 para rearings e 0.785 para defecações)



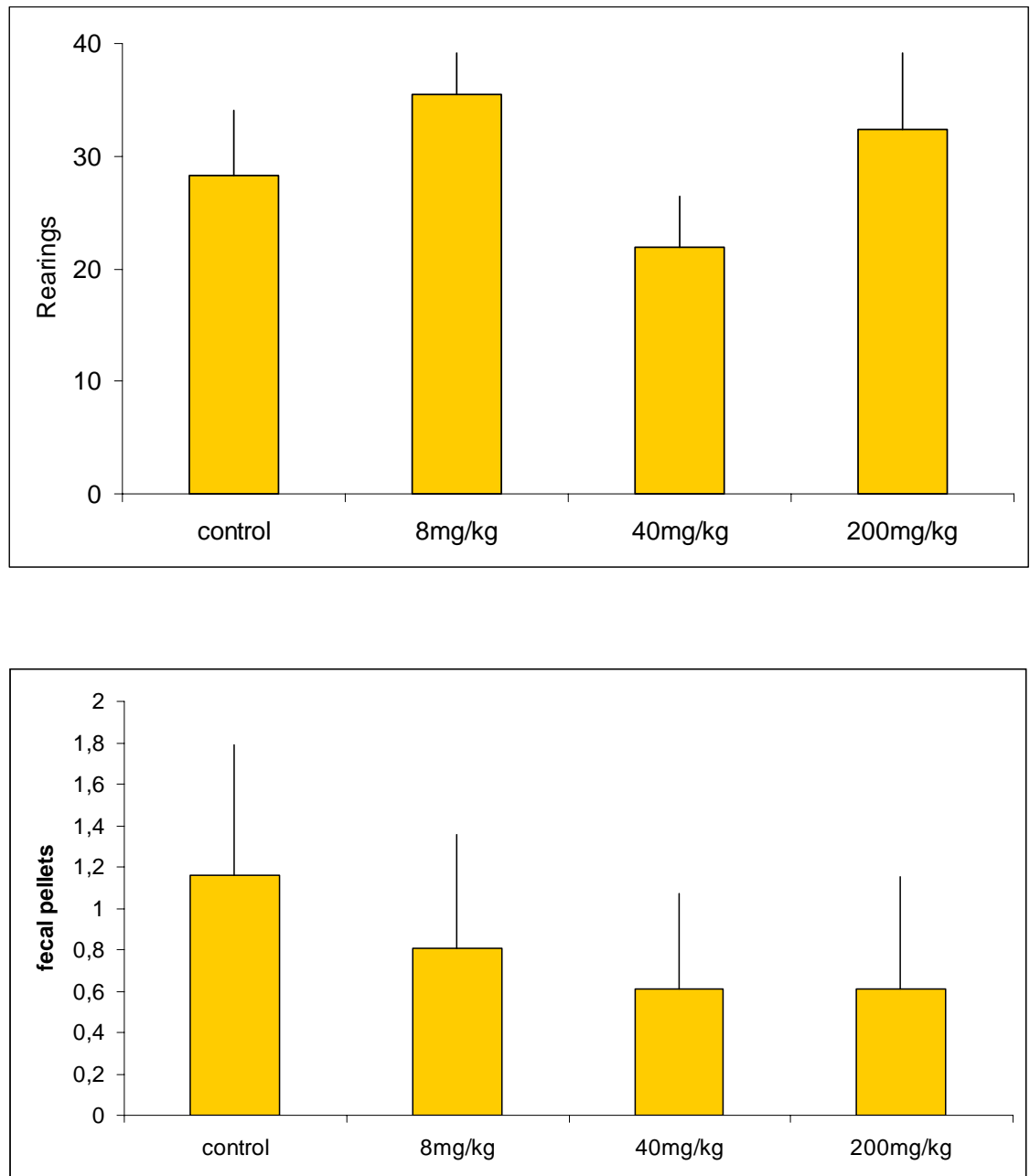


Fig.10- Habituação em campo aberto com camundongos recebendo injeção intra-peritoneal de ciclofosfamida (8, 40, 200 mg/kg) ou controle salino, 1 semana antes do teste comportamental. Os dados são expressos como média \pm erro padrão para latência(s), número de cruzamentos, número de rearings e número de defecações. N=11-12 animais por grupo. Não houve diferenças significativas entre grupos (P=0.372 para latências, 0.088 para cruzamentos, 0.090 para rearings e 0.053 para defecações)

**QUINTA PARTE - ARTIGO 2 -
TRADUÇÃO PARA LÍNGUA PORTUGUESA**

QUIMIOTERAPIA E FUNÇÃO COGNITIVA: ATUALIDADES E PERSPECTIVAS

André Borba Reiriz¹, Gustavo Kellermann Reolon², Thales Preissle², João Antônio Pegas Henriques², Rafael Roesler^{2,3} and Gilberto Schwartzmann⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

² Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

³Laboratório de Neurofarmacologia Pré-clínica, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brasil

⁴ Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Fundação Sul-Americana para Desenvolvimento de Novas Drogas Anti-Câncer, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

*Correspondência para o autor: Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, Campus Centro/UFRGS, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: +55 51 3316 3183, Fax: +55 51 3316 6084, E-mail: rroesler@terra.com.br

RESUMO

Evidências clínicas sugerem a possibilidade de disfunção cognitiva em pacientes sob tratamento quimioterápico, principalmente naqueles sob tratamento adjuvante no câncer de mama. Esses tratamentos têm melhorado os resultados curativos e, dessa forma, as preocupações se direcionam para efeitos colaterais crônicos. Assim, nós realizamos uma revisão dos estudos publicados avaliando o papel da quimioterapia na função cognitiva. A maioria dos estudos apresentou dificuldades metodológicas, tais como: a ausência de avaliação inicial validada e tamanho de amostra insuficiente. Estudos futuros devem incluir avaliações com maior número de pacientes, utilizando controles apropriados e com desenho prospectivo. A carência de informação a respeito dos mecanismos envolvidos nesse dano, torna necessário iniciativas de pesquisa desenvolvendo novos modelos animais que utilizem diferentes testes e agentes anticâncer.

Palavras-chave: função cognitiva; ciclofosfamida; camundongos

1 INTRODUÇÃO

O tratamento do câncer incorpora múltiplas terapias, incluindo tratamento cirúrgico, radioterapia e abordagens sistêmicas. Por isso, em razão dessas estratégias, os resultados curativos têm sido implementados, e desse modo as preocupações com eventos adversos tardios tornam-se razão de maior interesse.

Vários estudos têm sugerido disfunção cognitiva em pacientes submetidos à quimioterapia, especialmente em pacientes submetidas a tratamento adjuvante de câncer de mama, porém essa disfunção é freqüentemente avaliada através de testes clínicos neuropsicológicos e assim tornando essas avaliações sujeitas a dificuldades metodológicas. A função cognitiva incorpora capacidades como: memória, atenção, aprendizado, cálculo, linguagem. Desse modo, fatores geradores de confusão no bem estar emocional podem estar presentes no momento do diagnóstico de câncer e assim afetarem o sistema nervoso central.

Em razão desse contexto torna-se necessário um melhor entendimento fisiopatológico, desenvolvimento de estratégias investigativas que incluam estudos clínicos de maior poder estatístico e prospectivo, desenvolvimento de modelos animais e uso das diversas drogas quimioterápicas utilizadas no tratamento oncológico. Assim, realizamos uma revisão das evidências a cerca do dano cognitivo gerado pelo tratamento sistêmico quimioterápico.

2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

Diversos mecanismos têm sido considerados na explicação de possíveis déficits cognitivos relacionados à quimioterapia, incluindo a participação de citocinas liberadas por tecido neoplásico (interleucina 1, 2, 6, interferon e fator de necrose tumoral-FNT) , que em modelos animais demonstraram produzir anorexia, letargia, depressão e distúrbio de aprendizado¹. Meyers et al. sugerem maior distúrbio cognitivo em pacientes sob tratamento imunoterápico (interferon, interleucina e FNT)². Distúrbios vasculares e alterações hormonais também poderiam predispor não só déficit cognitivo em razão da tendência trombogênica por dano endotelial³, mas também pela conhecida presença de receptores estrogênicos no tecido cerebral, que modulam humor e função cognitiva⁴ . Então, sabendo que em torno de 70% das mulheres pré-menopáusicas têm amenorréia induzida pela quimioterapia, essa informação poderia explicar a disfunção de cognição⁵. A semelhança de estrógenos, os andrógenos têm controle sobre a organização cerebral e estudos em modelos animais mostram a testosterona com influência sobre receptores e neurotransmissores.⁶

Também se cogita que o dano cerebral possa ser causado por anemia secundária à quimioterapia, fato já especulado no estudo de Jacobsen et al⁷, onde pacientes com decréscimo da hemoglobina apresentavam maiores problemas de memória e de concentração. Eritropoietina recombinante humana pode atravessar a barreira hemato-encefálica⁸ e exercer efeito neuroprotetor através da eritropoiese e da ação excitatória sobre receptores neuronais⁹.

Evidências sugerem que ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil reduziram a resistência celular a danos oxidativos e aumentariam a permeabilidade da barreira hemato-encefálica a moléculas neurotóxicas¹⁰. Ao analisar outros

agentes quimioterápicos como cisplatina, ifosfamida e citarabina, percebemos toxicidade neurológica na forma de convulsões e de encefalopatia¹¹. A maioria dos agentes quimioterápicos administrados sistemicamente não atravessa a barreira hemato-encefálica em doses significantes, porém a penetração no encéfalo pode ser modificada pela variabilidade genética nos transportadores da barreira hemato-encefálica¹². Dados oriundos de estudos em animais sugerem que doses muito pequenas de quimioterápicos frequentemente utilizados, podem causar morte celular e reduzida divisão celular em estruturas cerebrais cruciais para cognição, mesmo com doses que não produzam efetiva morte de células neoplásicas¹³. Em virtude de a ciclofosfamida estar presente nos diversos protocolos quimioterápicos de câncer de mama, sendo essa patologia a razão do maior volume de indicações de quimioterapia com intenção curativa. Essa droga tem sido alvo de especial interesse quanto ao seu impacto na função cognitiva dos pacientes.

3 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS

Em 2003 Dr.Koolhaas descreveu modelo animal com alta dose de quimioterapia de forma única e avaliação cognitiva 6 semanas após, demonstrando anormalidades no aprendizado espacial e ansiedade¹⁴. Lee et al.¹⁰ descrevem modelo de ratos que receberam altas doses de 5-fluorouracil, ciclofosfamida ou solução salina, por 5 ciclos em intervalos de 4 semanas, sem evidência de déficit cognitivo, inclusive com melhora do aprendizado e da plasticidade sináptica.

Reiriz et al¹⁵ demonstraram dano cognitivo agudo em modelo utilizando camundongos que recebiam alta dose de ciclofosfamida. Esses animais receberam, por via intraperitoneal, doses de 8,40 e 200mg/kg, enquanto o braço controle recebeu solução salina. Os camundongos que receberam dose de 40 ou 200 mg/kg, 1 dia antes do treinamento, apresentaram dano de memória aversiva após 24 h.

4 ESTUDOS CLÍNICOS

4.1 Câncer de Mama

A maioria dos estudos clínicos que avaliam déficit cognitivo em pacientes oncológicos envolve pacientes portadores de neoplasia de mama e sob tratamento adjuvante. Vam Dam et al¹⁶ avaliaram pacientes definidas como de alto risco, recebendo quimioterapia em dose convencional, alta dose e controle, seguida de radioterapia loco-regional e tamoxifeno. Dano cognitivo foi evidenciado em 32%, 17% e 9% dos pacientes sob dose alta, convencional e controle, respectivamente. O risco cognitivo foi significativamente maior em mulheres sob alta dose de quimioterapia ($p=0.043$, odds ratio 8.2).

Em estudo de Schagen et al¹⁷, 39 pacientes com câncer de mama inicial receberam tratamento quimioterápico utilizando ciclofosfamida, metotrexate e 5-Fluorouracil e 34 pacientes foram controles sem terapia adjuvante, assim 28% dos pacientes no grupo de tratamento quimioterápico apresentaram dano cognitivo, enquanto no grupo controle, somente 12%.

Wieneke¹⁸ evidenciou dano em teste neuropsicológico, em 21 dentre 28 pacientes, após quimioterapia adjuvante em câncer de mama inicial. Brezden et al¹⁹ demonstraram maior déficit cognitivo em 31 pacientes recebendo quimioterapia, com dano demonstrado em memória e na linguagem.

Um pequeno estudo prospectivo, conduzido por Wefel et al²⁰, avaliou 18 pacientes e evidenciou um terço de disfunção cognitiva na avaliação inicial e dois terços ao término da quimioterapia. Recentemente em 2005, Fan et al²¹ publicaram a maior avaliação prospectiva de fadiga, sintomas pós-menopausa e função cognitiva em 104 pacientes submetidas à quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante

por câncer de mama, revelando recuperação desse dano nas avaliações após 1 e 2 anos.

4.2 Outros Tumores

Meyers et al²² avaliaram a função cognitiva em pacientes com câncer de pulmão pequenas células, após quimioterapia e radioterapia sobre o tórax, não havendo evidência de diferença nos 25 pacientes analisados. Gregor et al²³ avaliaram pacientes sob remissão completa após quimioterapia e com diagnóstico de carcinoma de pulmão pequenas células, assim foi realizada randomização para radioterapia profilática em sistema nervoso central. As avaliações após essas terapias não demonstraram deterioração cognitiva.

Chen et al²⁴ realizaram pequeno estudo com 37 pacientes acima de 70 anos e diversos tumores sólidos, sem demonstrar dano cognitivo ao final do tratamento quimioterápico.

Em 2003, Malmstrom et al²⁵ mostraram em 40 pacientes com neoplasia ovariana submetidas a tratamento quimioterápico um declínio de memória na comparação com mulheres saudáveis. Em análise de 65 pacientes com câncer de próstata avançado, foi evidenciado desempenho deteriorado em testes de memória naqueles que receberam goserelina.²⁶

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As complicações tardias dos tratamentos anticâncer ganham destaque, incluindo o dano cognitivo, em razão dos melhores resultados de sobrevida e conseqüentes limitações potenciais nas tarefas diárias e na inclusão social de modo amplo.

Um número pequeno de estudos tem avaliado o impacto cognitivo do tratamento quimioterápico, com evidência de diversas dificuldades metodológicas, incluindo a ausência de um teste neuropsicológico adequadamente validado que considere as diversas heterogeneidades desse contexto. Desse modo, percebemos estudos com pequeno número de pacientes que não consideram variáveis hormonais e medicamentos de uso concomitante, incluindo os antagonistas de serotonina e corticoesteróides, assim não permitindo excluir um mecanismo indireto de dano cognitivo. Também existe dificuldade na avaliação inicial em razão de tratar-se de período conturbado envolvendo procedimentos anestésicos, cirúrgicos, um diagnóstico assustador e o temor da quimioterapia, podendo assim interferir na função cognitiva.

Até hoje temos apenas dois estudos de caráter prospectivo, porém um deles com apenas 18 pacientes, conduzido por Wefel et al²⁰ e uma publicação de Fan et al²¹ com 104 pacientes submetidos à quimioterapia e 102 indivíduos no grupo controle. Ambos expressam uma tendência de recuperação do dano cognitivo inicialmente demonstrado, após 1 e 2 anos de seguimento. Esses resultados são convergentes com os estudos pré-clínicos de Reiriz et al¹⁵ e Lee et al¹⁰ que não evidenciaram danos cognitivos tardios, e sim deterioração aguda nos modelos animais.

Assim, torna-se imperativo a busca de aprimoramento no conhecimento dos possíveis mecanismos de dano cognitivo, ampliando os agentes quimioterápicos avaliados, explorando os modelos animais, realizando um maior número de estudos prospectivos, com maior número de pacientes e desenvolvendo testes que melhor reproduzam as múltiplas tarefas cotidianas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, et al. Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 445-452.
2. Meyers CA, Abbruzzese JL. Cognitive functioning in cancer patients: effects of previous treatment. *Neurology* 1992; 42: 434-436.
3. Levine MN, Gent M, Hirsh J, et al. The thrombogenic effect of anticancer drug therapy in women with stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1988, 318: 404-407.
4. McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999; 20: 279-307.
5. Reyno LM, Levine MN, Skingley P, et al. Chemotherapy-induced amenorrhoea in a randomized trial of adjuvant chemotherapy duration in breast cancer. *Eur J Cancer* 1992; 29: 21-23.
6. Nakamura N, Fujita H, Kawata M. Effects of gonadectomy on immunoreactivity for choline acetyltransferase in the cortex, hippocampus, and basal forebrain of adult male rats. *Neurosci* 2002; 109: 473-485.
7. Jacobsen PB, Thors CL, Cawley M, et al. Relation of decline in hemoglobin to cognitive functioning and fatigue during chemotherapy treatment. *Proc ASCO* 2002; 21: 386(abstr).
8. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10526-10531.
9. Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA : oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000; 30: 271-278.
10. Lee GD, Longo DL, Wang Y, et al. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 198-205.
11. Minisini A, Atalay G, Bottomley A, et al. What is the effect of systemic anticancer treatment on cognitive function? *The Lancet Oncology* 2004; 5: 273-282.
12. Ahles TA, Saykin AJ. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. *Nature Reviews* 2007; 7: 192-201.
13. Dietrich J, Han R, Yang Y, et al. CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *J Biol* 2006; 5:22 (Epub ahead of print).

14. Tannock IF, Ahles TA, Ganz PA, et al. Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer: report of a workshop. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2233-2239.
15. Reiriz AB, Roesler R, Schwartzmann G, et al. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5000-5001.
16. Van Dam FSAM, Schagen SB, Muller MJ, et al. Impairment of cognitive function in women receiving adjuvant treatment for high-risk breast cancer: high dose versus standard-dose chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 210-218.
17. Schagen SB, Van Dam FSAM, Muller JM, et al. Cognitive deficits after postoperative adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 640-650.
18. Wieneke MH, Dienst ER. Neuropsychological assessment of cognitive functioning following chemotherapy for breast cancer. *Psychooncology* 1995; 4: 61-66.
19. Brezden CB, Phillips KA, Abdollel M, et al. Cognitive function in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2695-2701.
20. Wefel JS, Lenzi R, Theriault RL, et al. The cognitive sequelae of standard-dose adjuvant chemotherapy in women with breast carcinoma: results of a prospective, randomized, longitudinal trial. *Cancer* 2004; 100: 2292-2299.
21. Fan HGM, Tchen NH, Yi QL, et al. Fatigue, menopausal symptoms and cognitive function in women after adjuvant chemotherapy for breast cancer: 1 and 2 year follow-up of a prospective controlled study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8025-8032.
22. Meyers CA, Byrne KS, Komaki R. Cognitive deficits in patients with small-cell lung cancer before and after chemotherapy. *Lung Cancer* 1995; 12:231-235.
23. Gregor A, Cull A, Stephens RJ, et al. Prophylactic cranial irradiation is indicated following complete response to induction therapy in small-cell lung cancer: results of a multicentre randomised trial. *Eur J Cancer* 1997;33:1752-1758.
24. Chen H, Cantor A, Meyer J, et al. Can older patients tolerate chemotherapy? A prospective pilot study. *Cancer* 2003; 97: 1107-1114.
25. Malmstrom H. Cognitive functions in patients with ovarian cancer receiving chemotherapy. *Proc ASCO* 2003;22:462.
26. Green HJ, Pakenham KI, Headley BC, et al. Altered cognitive function in men treated for prostate cancer with LHRH analogues and cyproterone acetate: a randomized controlled trial. *BJU Int* 2002; 90: 427-432.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados de nossos experimentos confirmam o papel da quimioterapia no dano cognitivo, através do uso de ciclofosfamida em caráter agudo. Assim, os recentes estudos reforçam a relação entre agentes anti-câncer e disfunção cognitiva dando início à geração de um melhor conhecimento a cerca de uma freqüente queixa de pacientes sob tratamento quimioterápico. As evidências atuais sugerem uma tendência de recuperação do dano cognitivo após o tratamento, tanto em avaliações com modelos animais quanto em estudos clínicos. Desse modo, é possível afirmar que em um cenário até pouco tempo carente de informação, já possuímos dados a serem compartilhados com nossos pacientes.

Dessa forma, torna-se fundamental que os grupos envolvidos nesses experimentos prossigam com sua investigação a fim de avaliarem diferentes agentes quimioterápicos, suas combinações e a reversibilidade do dano, desenvolvendo novos modelos animais e criando um melhor respaldo para estudos clínicos prospectivos.

ANEXOS

Cancer Chemotherapy and Cognitive Function in Rodent Models: Memory Impairment Induced by Cyclophosphamide in Mice

To the Editor: The study by Lee et al. (1) is the first report on the effects of cancer chemotherapy on cognitive function in rodent models. Given the increasing concern about cognitive dysfunction in patients receiving chemotherapy, the development of animal models to characterize chemotherapy-induced cognitive impairment has been proposed as a priority for future research (2, 3). Unexpectedly, Lee et al. (1) found an enhancement of both memory and hippocampal synaptic plasticity following several weeks of treatment with cyclophosphamide in rats.

We too have used rodent models to investigate the cognitive effects of cyclophosphamide. In contrast to the findings reported by Lee et al. (1), we have observed a transient memory impairment following cyclophosphamide administration in mice. In our experiments, male CF1 mice (70-90 days of age) were trained and tested in step-down inhibitory avoidance conditioning, a type of emotionally motivated, hippocampus-dependent memory task where animals learn to associate a location in the training apparatus with a footshock. Inhibitory avoidance training was carried out as described previously (4). Either 1 day or 1 week before behavioral training, animals were given a systemic injection of cyclophosphamide (8, 40, or 200 mg/kg, i.p.). Control animals were injected with saline. Mice treated with cyclophosphamide at 40 or 200 mg/kg 1 day before training showed significant impairment of 24-hour memory retention when compared with control animals [mean \pm SE retention test latencies (seconds) were 61.30 ± 20.93 in the control group, 80.91 ± 25.02 in the group treated with 8 mg/kg cyclophosphamide, 22.0 ± 12.02 in the group treated with 40 mg/kg cyclophosphamide, and 12.36 ± 2.87 in the group treated with 200 mg/kg cyclophosphamide; both P s < 0.01 compared with the control group with two-tailed Mann-Whitney U tests; $n = 10-11$ animals per group]. There was no significant difference among groups in training performance [overall mean \pm SE training trial latency (seconds) was 12.77 ± 1.46 ; $P = 0.16$]. A control experiment showed that cyclophosphamide did not affect open field behavior (4), indicating that the impairing effects of cyclophosphamide on inhibitory avoidance could not be attributed to drug-induced alterations in locomotion, motivation, or anxiety (data not shown). Systemic administration of cyclophosphamide (8, 40, or 200 mg/kg, i.p.) did not affect inhibitory avoidance memory when given 1 week before training (data not shown).

Our results show that a single administration of cyclophosphamide induces memory impairment in a mice model

of aversive conditioning. Further studies are required to characterize cognitive deficits induced by cancer chemotherapy in animal models and investigate the mechanisms underlying the differential effects of cyclophosphamide on memory in different experimental paradigms.

André B. Reiriz

Faculty of Medicine,
University of Caxias do Sul
Caxias do Sul, Rio Grande do Sul,
Brazil

Gustavo K. Reolon

Thales Preissler

Joemerson O. Rosado

João Antônio P. Henriques

Center for Biotechnology,
Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul,
Brazil

Rafael Roesler

Gilberto Schwartzmann

Graduate Program in Medical Sciences,
Faculty of Medicine,
Federal University of Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul,
Brazil

References

1. Lee GD, Longo DL, Wang Y, et al. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:198-205.
2. Minisini A, Atalay G, Bottomley A, Puglisi F, Piccart M, Biganzoli L. What is the effect of systemic anticancer treatment on cognitive function? *Lancet Oncol* 2004;5:273-82.
3. Tannock IF, Ahles TA, Ganz PA, Van Dam FS. Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer: report of a workshop. *J Clin Oncol* 2004;22:2233-9.
4. Roesler R, Walz R, Quevedo J, et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrPc. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;71:349-53.

In Response: In their Letter to the Editor, Reiriz et al. have questioned the generalization of results that we recently presented about a rodent model to assess cognitive impairments induced by cyclophosphamide and 5-fluorouracil (1). In our study, we evaluated the effects of chronic regimens of these two chemotherapeutic agents on performance of young and aged female F344 rats in two complex learning tasks, the Morris water maze and the Stone 14-unit T-maze. Both tasks involve multiple trials spread over several days and required the rat to learn and remember complex spatial relationships. Our results showed that, with 8 weeks of recovery from the chemotherapeutic regimens, rats treated with either cyclophosphamide (100 mg/kg) or 5-fluorouracil (150 mg/kg) surprisingly did significantly better than untreated controls in both learning tasks. However, after providing even longer periods of recovery, 29 to 42 weeks, we observed no significant differences

in maze performance between treated rats and controls. Thus, despite the toxicity of the regimens of cyclophosphamide and 5-fluorouracil as applied, the treatments produced a transient improvement in performance and, with longer periods of recovery, no long-term negative effects on cognition as measured by these tasks.

Additional support for this conclusion was provided in our electrophysiologic assessment of long-term potentiation as measured in a slice preparation taken from the brains of rats during and after cyclophosphamide treatment. In hippocampal slices recorded from rats after both 8 and 53 weeks of recovery from 18 weeks of cyclophosphamide treatment, we noted enhanced long-term potentiation. In contrast, we observed impaired long-term potentiation in slices obtained from rats during cyclophosphamide treatment (15 weeks).

Reiriz et al. have addressed a different question. Specifically, they assessed acute toxic effects of a single dose of a chemotherapeutic agent. Male CD-1 mice were given one injection of cyclophosphamide (8, 40, and 200 mg/kg) either 1 day or 1 week before testing in a step-down inhibitory avoidance task. This paradigm involves a one-trial task, which assesses the strength of the association made between the natural action of stepping down from a platform and a mild footshock as a negative reinforcement received after stepping onto the grid floor. Mice treated with either of the two highest doses showed impaired memory when evaluated 24 hours after acquisition training. In this situation, the mouse was returned to the platform after 1 day or 1 week, and the latency to step down onto the grid floor where it had previously received the mild footshock was recorded as the measure of memory. When mice were tested following 1 week of recovery from a single injection of cyclophosphamide, they showed no impaired memory at any dose. Thus, it would seem only that the acute effects of cyclophosphamide were associated with the memory deficit observed in mice in this simple learning task. This result is consistent with our finding of decreased long-term potentiation during cyclophosphamide therapy (1).

It is possible that noncognitive performance effects of acute treatment influenced the results of Reiriz et al. They did not report any data on toxicity, body weight changes, or food intake in these mice. Although the data were not provided, they did report that the cyclophosphamide treatment had no significant effects on open-field performance. Thus, they concluded that the performance differences could not be attributed to effects of the drug on locomotion, anxiety, and motivation. However, if the treatment was having untoward effects on performance in general, such as a malaise or fatigue, then the affected mouse might show a slower time in the initial component of the task. Although they did not provide the actual data, they reported that the groups did not significantly differ in the initial step-down latencies as supported by a Mann-Whitney *U* test with $P = 0.16$. Given this probability value based on a nonparametric test, we would deduce that there was considerable variability observed in this measure of initial step-through latency. If the median scores had been reported, they might show that the mice receiving the higher doses of cyclophosphamide were exhibiting longer latencies, thus indicating a noncognitive performance deficit. The authors should reveal these data.

As we discussed in our article, we agree with Reiriz et al. that additional studies using animal models of cognitive deficits

induced by cancer chemotherapy are needed to clarify reports in the literature about this clinical problem. There is a critical lack of well-controlled studies in appropriate animal models. The results of Reiriz et al. examine acute rather than chronic toxicity of a cancer chemotherapeutic agent, and their results do not contradict any conclusion we reached about the behavioral toxicity of cyclophosphamide.

A fundamental problem in assessing chemotherapy-induced cognitive decline is that cognition declines with age in people who have not received chemotherapy [see Fig. 1 from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (2)]. It is important that future studies attempting to measure and document treatment-related cognitive decline take into account that the baseline is not level; age-related cognitive decline also happens at a measured rate in people who do not receive cancer treatment. They just do not have chemotherapy to blame.

Garrick D. Lee

Donald K. Ingram

Laboratory of Experimental Gerontology,
Intramural Research Program,
National Institute on Aging, NIH,
Baltimore, Maryland

Dan L. Longo

Laboratory of Immunology,
Intramural Research Program,
National Institute on Aging, NIH,
Baltimore, Maryland

References

- Lee GD, Longo DL, Wang Y, et al. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12:198–205.
- Giambra LM, Arenberg D, Kawas C, Zonderman AB, Costa PT, Jr. Adult life span changes in immediate visual memory and verbal intelligence. *Psychol Aging* 1995; 10:123–39.

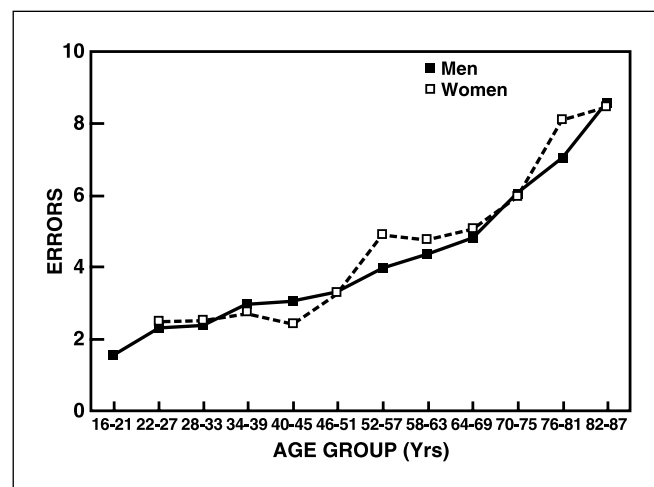


Fig. 1. Age-related decline in memory performance assessed as errors made on the Benton visual memory test as measured in healthy men and women in the Baltimore Longitudinal Study of Aging (2).