

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

**DISFUNÇÃO COGNITIVA INDUZIDA POR FÁRMACOS**  
**ANTINEOPLÁSICOS EM MODELOS ANIMAIS: EFEITOS DA**  
**DOXORRUBICINA**

**Autor: Pedro Emanuel Rubini Liedke**

**Orientador: Prof. Gilberto Schwartzmann**

**Co-Orientador: Prof. Rafael Roesler**

**Dissertação de Mestrado Acadêmico**

**Março 2009**

L718d **Liedke, Pedro Emanuel Rubini**

Disfunção cognitiva induzida por fármacos antineoplásicos em modelos animais: efeitos da doxorubicina / Pedro Emanuel Rubini Liedke ; orient. Gilberto Schwartzmann ; co-orient. Rafael Roesler. – 2009. 40 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Transtornos cognitivos 2. Antineoplásicos 3. Modelos animais de doenças 4. Doxorubicina I. Schwartzmann, Gilberto II. Roesler, Rafael III. Título.

NLM: WM 204

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus Pais, Prof. Dr. Enno Dagoberto Liedke Filho e Prof. Dra. Elida Rubini Liedke por terem sido minhas fontes de inspiração e modelos de caráter e conduta. Agradeço à Maria Carolina Tortorelli Torrens pelo amor, apoio e carinho dedicados. Agradeço também ao Gustavo K. Reolon pelos ensinamentos e apoio durante a realização dos experimentos e nas revisões do texto. Finalmente, agradeço aos professores e orientadores Dr. Gilberto Schwartzmann e Dr. Rafael Roesler pelas oportunidades e pela dedicação ao meu crescimento como profissional.

<b>Sumário</b>	
<b>1. Resumo</b>	<b>página 4</b>
<b>2. Introdução</b>	<b>página 5</b>
<b>Figura 1</b>	<b>página 7</b>
<b>3. Revisão de Literatura</b>	<b>página 8</b>
<b>3.1 Estudos Clínicos</b>	<b>página 8</b>
<b>3.2 Estudos Experimentais</b>	<b>página 9</b>
<b>3.3 Conclusão</b>	<b>página 12</b>
<b>Figura 2</b>	<b>página 13</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>página 14</b>
<b>5. Referências da Revisão de Literatura</b>	<b>página 15</b>
<b>6. Artigo Científico em Inglês: Systemic administration of doxorubicin impairs aversively motivated memory in rats</b>	<b>página 19</b>
<b>Abstract</b>	<b>página 21</b>
<b>Introduction</b>	<b>página 22</b>
<b>Methods</b>	<b>página 23</b>
<b>Results</b>	<b>página 26</b>
<b>Discussion</b>	<b>página 27</b>
<b>References</b>	<b>página 32</b>
<b>Figure 1</b>	<b>página 34</b>
<b>Figure 2</b>	<b>página 35</b>
<b>Figure 3</b>	<b>página 36</b>
<b>7. Considerações Gerais</b>	<b>página 37</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>página 39</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>página 39</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>página 40</b>

## **1. Resumo**

A literatura médica tem acumulado evidência da associação de alterações cognitivas com a quimioterapia sistêmica para câncer. Estima-se que entre 17 a 34% dos pacientes permaneçam com alterações em longo prazo após o tratamento. A maioria dos estudos clínicos publicados sobre este tema foi realizado com pacientes portadoras de câncer de mama, porém alterações também foram encontradas em pacientes portadores de tumores de pulmão e linfomas. Os mecanismos pelos quais estas disfunções ocorrem não estão bem esclarecidos. As principais hipóteses incluem, entre outras, dano neuronal por baixas concentrações de quimioterápicos no sistema nervoso central, determinados polimorfismos genéticos que alteram propriedades de barreira hemato-encefálica e do metabolismo neuronal, dano no DNA neuronal por estresse oxidativo, alterações hormonais e desregulação de citocinas. Modelos experimentais com animais têm sido desejados como forma de estudar os mecanismos pelos quais determinadas drogas ou suas combinações causam estas alterações. Entretanto, há poucos estudos utilizando modelos animais publicados. Neste trabalho nos propomos a investigar o efeito da doxorrubicina, uma medicação comumente utilizada na prática clínica, em um modelo experimental de memória aversiva de ratos Wistar utilizando testes de esquiva inibitória e habituação.

## 2. Introdução

Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2006 apontavam que seriam esperados 472.050 novos casos de câncer no Brasil (Ministério da Saúde, 2005). Destes, 49.700 casos eram esperados no estado do Rio Grande do Sul. As taxas de mortalidade apuradas pelo INCA entre os anos de 2004 e 2005 foram de 279.248 óbitos no Brasil, sendo 28.390 no Rio Grande do Sul com uma taxa ajustada de 151,84/ 100.000 mortes entre os homens e 113,52/100.000 mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2009) (Figura 1).

Após o diagnóstico de câncer muitos pacientes serão submetidos a tratamentos com intenção curativa ou paliativa que incluem quimioterapia. As toxicidades sistêmicas dos diversos agentes quimioterápicos, como êmese, mucosite e alterações gastro-intestinais são extensamente conhecidas e documentadas. Entretanto, diversos estudos têm sugerido que o tratamento quimioterápico pode causar, além de efeitos sistêmicos, alterações cognitivas nos pacientes (Ahles et al., 2007; Minisini et al., 2004; Tannock et al., 2004). Estas alterações são freqüentemente tratadas na literatura pela alcunha de “*Chemobrain*” ou “*Chemo-fog*” (Tannock et al., 2004) e, bem menos estudados, têm recebido crescente atenção por parte dos profissionais de saúde, pesquisadores e pacientes devido à sua repercussão na vida daqueles que sobreviveram após um tratamento para câncer. Historicamente acreditava-se que estas alterações cognitivas eram causadas por fatores psicológicos tais como depressão e ansiedade, além de outros efeitos associados ao tratamento, tais como fadiga, porém estudos controlados têm demonstrado consistentes associações entre quimioterapia e perda cognitiva (Ahles et al., 2007). Estima-se que alterações cognitivas de longo prazo persistem em 17 a 34% dos pacientes (Ahles et al., 2007).

A maioria dos estudos clínicos realizados abordando este tema tem pesquisado os efeitos da quimioterapia sobre a cognição em mulheres após o tratamento adjuvante do câncer de mama (Ahles et al., 2002; Brezden et al., 2000; De Jong et al., 2005; Falletti et al., 2005; Fan et al., 2005; Schagen et al., 2001; Silverman et al., 2006; Tchen et al., 2003; Van Dam et

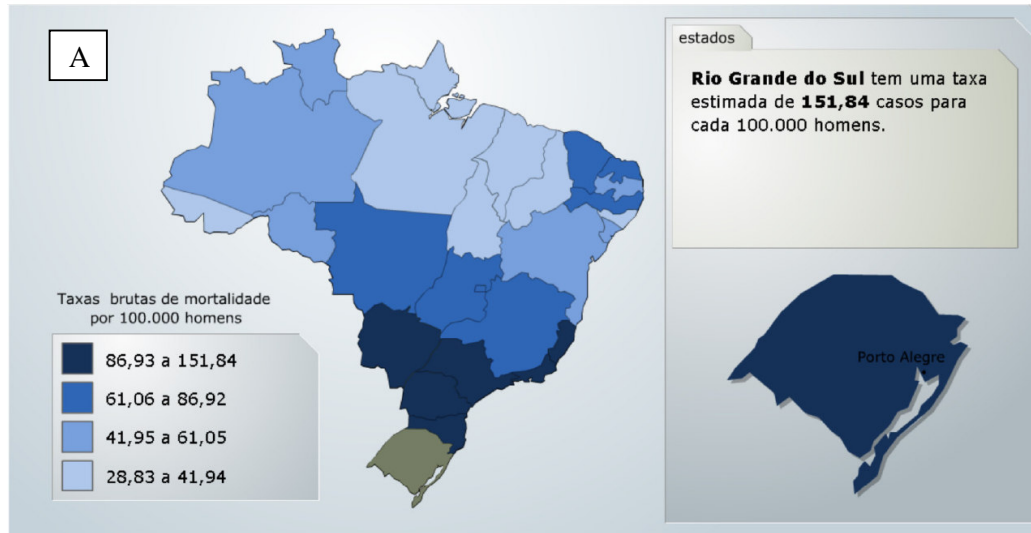
al., 1998), mas alterações também foram avaliadas em pacientes após o tratamento de outros tipos de tumores tais como linfomas, neoplasia pulmonar de pequenas células, neoplasias ovarianas e outros tumores sólidos (Ahles et al., 2002; Ahles et al., 1998; Minisini et al., 2004).

Apesar de estes estudos mostrarem uma consistente associação entre a realização de quimioterapia e a ocorrência de alterações cognitivas, o exato mecanismo como isto ocorre ainda não foi adequadamente elucidado. Muitos fatores podem influenciar no declínio cognitivo como o próprio envelhecimento, condições cognitivas prévias dos pacientes, alterações hormonais, alterações microangiopáticas, estresse oxidativo além de outras que são difíceis de isolar dentro de um contexto clínico (Ahles et al., 2007; Tannock et al., 2004) (Figura 2). Além disto, visto que geralmente os pacientes são submetidos à poliquimioterapia, a avaliação em estudos clínicos dificulta a associação de medicações individuais com o declínio cognitivo. Por estas razões, estudos experimentais têm sido desejados e estimulados pela comunidade científica e organizações de pacientes, visto que em condições controladas torna-se mais fácil de avaliar medicações e mecanismos específicos (Tannock et al., 2004).

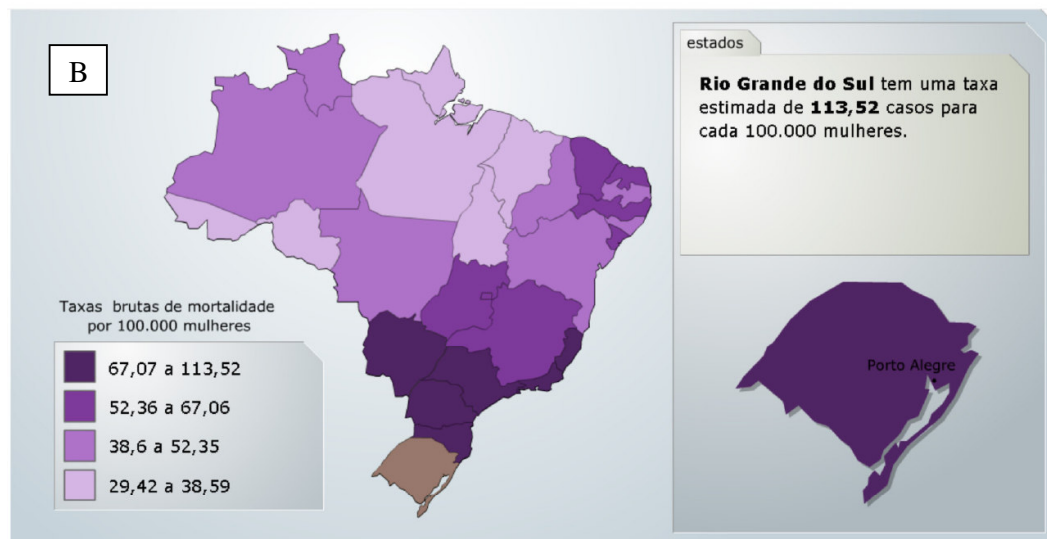
No objetivo de buscar novas evidências de alterações cognitivas induzidas por quimioterápicos de uso comum na prática clínica e elucidar seus possíveis mecanismos de ação, propomos no presente estudo avaliar os efeitos induzidos pela doxorrubicina, um agente quimioterápico comumente utilizado no tratamento curativo e paliativo de doenças neoplásicas comuns, tais como câncer de mama, linfomas, sarcomas, entre outros, na capacidade cognitiva e na memória em modelos experimentais com roedores.

**Figura 1.** Representação espacial das taxas brutas por idade pela população mundial de mortalidade por todas as neoplasias, nas Unidades da Federação, entre 2004 e 2005 por 100.000 homens (A) e mulheres (B) (Instituto Nacional do Câncer, 2009)

Representação espacial das taxas brutas por idade pela população mundial de mortalidade por todas as neoplasias, por 100.000 homens, nas Unidades da Federação, entre 2004 e 2005.



Representação espacial das taxas brutas por idade pela população mundial de mortalidade por todas as neoplasias, por 100.000 mulheres, nas Unidades da Federação, entre 2004 e 2005.





### 3. Revisão da literatura

#### 3.1 Estudos Clínicos

Falleti *et al* realizaram um estudo meta-analítico sobre as alterações cognitivas em pacientes que realizaram quimioterapia para câncer de mama e verificaram que a maioria dos estudos publicados na literatura são retrospectivos, possuem amostras pequenas, utilizaram diferentes instrumentos de aferição cognitiva e, desta forma, chegaram a diferentes resultados em relação aos domínios avaliados (atenção, memória, função motora, função executiva, habilidade espacial e linguagem) (Falleti et al., 2005). Nesta análise, os esquemas de quimioterapia mais utilizados foram ciclofosfamida/ metotrexate/ fluorouracil (CMF) em 38,5%, ciclofosfamida/ epirrubicina/ fluorouracil (FEC) em 19,5%, ciclofosfamida/ tiotepa/ carboplativa (CTC) com FEC em 18%, ciclofosfamida/ doxorubicina/ fluorouracil (CAF) em 8%, ciclofosfamida/ doxorubicina (AC) 6,3%, CMF com CAF 3%. Apesar de todas estas limitações técnicas, a avaliação conjunta destes estudos retrospectivos mostrou uma diminuição leve a moderada na capacidade cognitiva das pacientes que receberam quimioterapia. Apenas um estudo prospectivo, que avaliou pacientes até um ano após o tratamento, foi incluído nesta análise, sendo que este estudo mostrou melhor desempenho das pacientes que receberam quimioterapia nos parâmetros avaliados.

Em uma análise de um subgrupo de pacientes de um estudo que comparou quimioterapia em altas doses com quimioterapia convencional, Shagen *et al* realizaram uma avaliação neurofisiológica utilizando eletroencefalografia (EEG) e compararam estes pacientes com controles que não receberam quimioterapia (Schagen et al., 2001). Neste estudo, que incluiu pacientes com uma média de dois anos após o tratamento quimioterápico, foi verificada uma assimetria no ritmo alfa nos pacientes que realizaram quimioterapia em altas doses, em relação aos que receberam quimioterapia convencional e aos controles, sugerindo disfunção cortical ou subcortical. Neste estudo não foi possível realizar uma comparação entre os testes neurofisiológicos e neuropsicológicos. Este mesmo grupo realizou

outro estudo onde foram realizadas avaliações neurofisiológicas com EEG e neuropsicológicas em pacientes que haviam recebido CMF em comparação com pacientes que não receberam quimioterapia (Kreukels et al., 2005). Neste estudo foi verificada uma diminuição na amplitude do componente P3, sugerindo, de acordo com os autores, uma diminuição na capacidade de processamento de informações nestas pacientes.

Silverman *et al* realizaram um estudo utilizando PET *scan* para avaliar o fluxo e o metabolismo cerebral durante a realização de um teste neuropsicológico de memória curta em 16 paciente que haviam recebido quimioterapia adjuvante para câncer de mama, em comparação com 8 mulheres com câncer de mama que não receberam quimioterapia (Silverman et al., 2006). Neste estudo o tempo médio desde o diagnóstico das pacientes foi de 7,4 anos e, nas pacientes que receberam quimioterapia, o tempo decorrido desde o tratamento foi entre 5 e 10 anos. Este estudo demonstrou que, nas pacientes que haviam recebido quimioterapia, houve um aumento anormal na ativação e no metabolismo do córtex frontal inferior. Também nestas pacientes foi visto um aumento anormal na ativação do cerebelo posterior, próximo à linha média. Os autores postulam que a causa para esta ativação aumentada seria o recrutamento compensatório de maior número de neurônios frontais, possivelmente para compensar um metabolismo basal menor.

Um dos poucos estudos que avaliaram os efeitos da quimioterapia em pacientes tratados para outros tipos de câncer que não mama, foi realizado por Ahles *et al* (Ahles et al., 1998). Este grupo estudou alterações cognitivas causadas por quimioterapia e radioterapia em pacientes tratados para carcinoma de pequenas células de pulmão com ou sem warfarina. Neste estudo não houve diferença na avaliação neuropsicológica entre os grupos.

### **3.2 Estudos Experimentais**

As hipóteses mais comuns sobre os mecanismos envolvidos no déficit cognitivo induzido por quimioterápicos estão esquematizadas na Figura 2 e incluem coagulação de

pequenos vasos sanguíneos; dano neuronal causado por baixas concentrações de drogas no Sistema Nervoso Central (SNC); polimorfismos do gene *MDR1*, responsável pela transcrição da P-glicoproteína (P-gp) a qual é expressa por células endoteliais de capilares cerebrais, sendo responsável pelo transporte de muitos quimioterápicos para fora das células, e funciona no nível da barreira hemato-encefálica regulando a concentração de quimioterápicos no SNC; dano de DNA através de estresse oxidativo diretamente ou indiretamente pela produção de radicais livres, redução na capacidade antioxidativa e aumento nos níveis de ferro não quelado; redução no comprimento dos telômeros pelos agentes quimioterápicos; desregulação de citocinas e seu efeito sobre a modulação neuronal e glial, o reparo neuronal e a produção de neurotransmissores como dopamina e serotonina; polimorfismos no gene decodificador da apolipoproteína E (APOE) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); polimorfismos da catecol-metiltransferase-O (COMT) e sua conseqüente alteração no metabolismo da dopamina; redução nos níveis de hormônios tais como a testosterona e o estrogênio (Ahles et al., 2007; Tannock et al., 2004).

Existem poucos estudos experimentais publicados na literatura médica. Em um estudo anterior de nosso laboratório, Reiriz *et al.* (Reiriz et al., 2006) avaliaram os efeitos da ciclofosfamida na cognição de ratos através de testes com esquiva inibitória, uma forma de avaliação de memória dependente do hipocampo. Os animais que receberam doses de 40 ou de 200 mg/Kg de ciclofosfamida apresentaram pior desempenho na avaliação 24 horas após o tratamento, porém não uma semana após. Não houve diferença entre os grupos na capacidade de locomoção, motivação ou ansiedade avaliada através do teste de campo aberto, sugerindo que o efeito negativo sobre o condicionamento foi realmente devido a alterações na função hipocampal dos animais tratados.

Um grupo canadense liderado por Winocur realizou um experimento para avaliar as alterações cognitivas induzidas pela utilização da combinação de metotrexate e fluorouracil em camundongos (Winocur et al., 2006). Neste experimento, foram utilizados testes de

localização espacial dentro de um modelo de Labirinto Aquático de Morris. Este estudo demonstrou uma piora no desempenho dos animais que haviam recebido quimioterapia, em comparação ao grupo de controle, sugerindo alterações de memória espacial.

Em oposição aos resultados dos experimentos acima, o grupo liderado por Lee testou a memória espacial em ratos após o uso de ciclofosfamida ou fluorouracil e encontrou melhora transitória no desempenho destes animais (Lee et al., 2006). Neste experimento, animais jovens, com 7 meses de idade, foram tratados com 5 aplicações de ciclofosfamida, fluorouracil ou salina ao longo de 18 semanas. Após 7 semanas de recuperação, os animais foram treinados para localização espacial utilizando o Labirinto Aquático de Morris ou o Labirinto T de 5 braços. Os mesmos animais foram novamente testados 29 semanas após o final da quimioterapia. Na primeira bateria de treino, 7 semanas após a quimioterapia, os animais que receberam tratamento apresentaram desempenho significativamente melhor do que os controles. Já 29 semanas após o final do tratamento não houve diferença entre os grupos. Este mesmo experimento foi realizado com animais mais velhos, de 18 meses, e os resultados foram equivalentes. Também neste trabalho foram realizadas medições de potencial de longo prazo (LTP) em fatias de hipocampo *in vitro* de animais que receberam ciclofosfamida e controles. Nos animais avaliados durante o tratamento com ciclofosfamida não houve indução de LTP. Entretanto, 8 semanas após o tratamento, houve indução de LTP nos animais que receberam quimioterapia, efeito que se manteve até 53 semanas após o tratamento.

Seigers *et al* avaliaram a proliferação de células de hipocampo de ratos 3 semanas após a aplicação de metotrexate e obtiveram um efeito inibitório dependente de dose e significativo mesmo com a menor dose utilizada (Seigers et al., 2008). Neste mesmo estudo, animais foram treinados no Labirinto Aquático de Morris e testados 3 semanas após uma dose elevada de metotrexate (250 mg/Kg). Aqueles que receberam a medicação apresentaram uma maior latência para cruzar o local da plataforma em relação aos animais que receberam

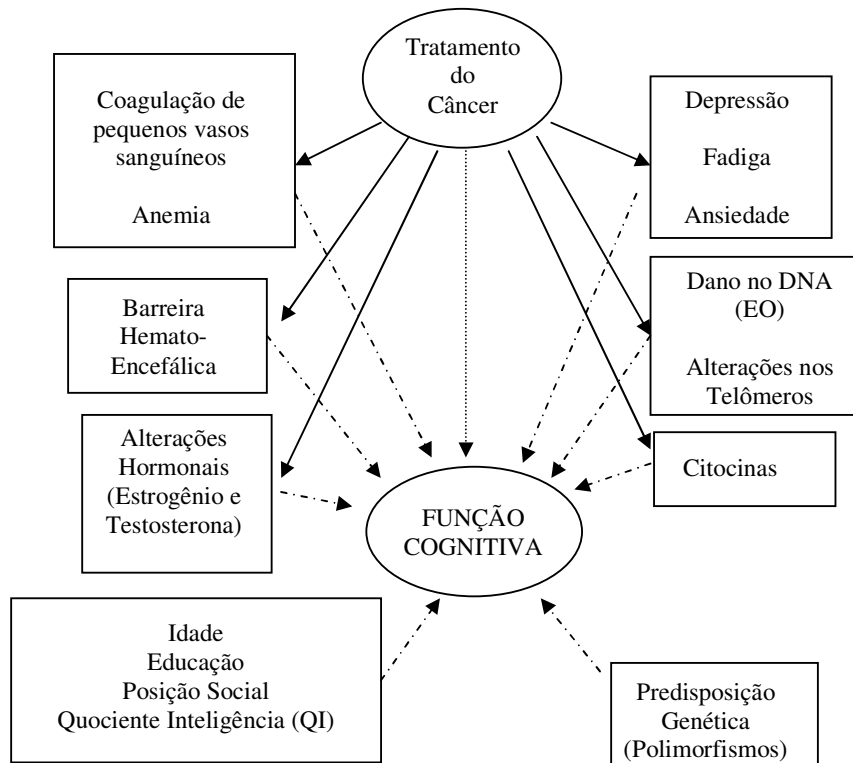
placebo. Além disto, animais que receberam a mesma dose de metotrexate tiveram dificuldades em distinguir objetos familiares de novos em um Teste de Distinção de Objetos, o que sugere alteração na função comparadora do hipocampo.

MacLeod *et al* aplicaram doses de doxorubicina (4 mg/Kg) e ciclofosfamida (40 mg/Kg) durante 3 semanas seguidas em ratas ooforectomizadas (MacLeod et al., 2007). Após uma semana estes animais foram treinados e testados em provas de condicionamento aversivo através do uso de uma campainha associado a choque elétrico. Os animais foram testados para memória contextual 24 horas após o treino através da reexposição ao ambiente e 48 horas após para resposta emocional com uso da campainha. Foram observadas diferenças em relação à resposta emocional com a reexposição ambiental, porém não com o sinal sonoro, sugerindo alterações hipocampais causadas por estes agentes.

### **3.3 Conclusão**

A associação entre déficit cognitivo e quimioterapia sistêmica para câncer tem sido constatada em diversos estudos clínicos. Entretanto, esta associação necessita ser controlada não somente para o uso das medicações, mas também para os fatores individuais de cada sujeito tais como escolaridade e capacidade cognitiva prévias (Minisini et al., 2004). A avaliação neuropsicológica faz uso de testes complexos, muitas vezes de difícil aplicação e existem importantes dificuldades técnicas na aplicação de metodologias ideais de pesquisa, como estudos prospectivos de longa duração. Os estudos clínicos também têm limitações na capacidade de avaliar a causa das alterações cognitivas, que são provavelmente multifatoriais (Figura 2). Por estas razões, crescente interesse tem surgido na utilização de modelos animais para avaliar a associação causal entre quimioterápicos específicos e alterações cognitivas, além dos possíveis mecanismos de ação que mediam esses efeitos (Tannock et al., 2004).

**Figura 2** – Modelo conceitual de fatores que podem influenciar a função cognitiva em pacientes que receberam tratamento quimioterápico (adaptado de Tannock et al 2004, Minisini et al 2004 e Ahles et al 2007) . EO: estresse oxidativo.



#### **4. Objetivos**

- 4.1** Avaliar os efeitos da administração sistêmica do agente antineoplásico doxorubicina sobre a aquisição, a consolidação, a expressão e a extinção da memória aversiva de curta e longa duração através da tarefa de esquivas inibitória em ratos;
- 4.2** Avaliar os efeitos da administração sistêmica de doxorubicina sobre a aquisição, a consolidação e a expressão da memória não-associativa através da tarefa de habituação em ratos;
- 4.3** Avaliar os efeitos da administração sistêmica de doxorubicina sobre locomoção, ansiedade e comportamento exploratório no teste de exploração ao campo aberto.

## 5. Referências da revisão da literatura

- Ahles, Tim A. , Saykin, Andrew J. , Furstenberg, Charlotte T., Cole, Bernard , Mott, Leila A. , Skalla, Karen , Bivens, Sarah , Mitchell, Tara , Greenberg, E. Robert and Silberfarb, Peter M. . Neuropsychologic impact of standard-dose systemic chemotherapy in long-term survivors of breast cancer and lymphoma. *J Clin Oncol* 2002;20: 485-493.
- Ahles, Tim A. , Silberfarb, Peter M. , Herndon II, James , Maurer, L. Herbert , Kornblith, Alice B , Aisner, Joseph , Perry, Michael C , Eaton, Walter L., Zacharski, Leo L. , Green, Mark R. and Holland, Jimmie C. . Psychologic and neuropsychologic functioning of patients with limited small-cell lung cancer treated with chemotherapy and radiation therapy with or without warfarin: A study by the cancer and leukemia group b. *J Clin Oncol* 1998;16: 1954-1960.
- Ahles, Tim A. and Saykin, Andrew J. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. *Nat Rev Cancer* 2007;7: 192-201.
- Brezden, Christine B., Phillips, Kelly-Anne, Abdolell, Mohamed, Bunston, Terry and Tannock, Ian F. Cognitive function in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18: 2695-2701.
- Danesi, R, Fogli, S, Gennari, A, Conte, P And and Del Tacca, M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* 2002;41: 431-444.
- De Jong, N. , Candel, M. J. J. M. , Schouten, H. C. , Abu-Saad, H. Huijjer and Courtens, A. M. . Course of mental fatigue and motivation in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 2005;16: 372-382.
- Falletti, Marina G. , Sanfilippo, Antonietta , Maruff, Paul , Weih, Leann and Phillips, Kelly-Anne The nature and severity of cognitive impairment associated with adjuvant chemotherapy in women with breast cancer: A meta-analysis of the current literature. *Brain Cogn* 2005;59: 60-70.



- Fan, Helen G. Mar, Houede-Tchen, Nadine, Yi, Qi-Long, Chemerynsky, Irene, Downie, Fiona P., Sabate, Kathryn and Tannock, Ian F. 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.
- Intituto Nacional do Câncer. (2009). "Atlas de mortalidade por câncer." Retrieved 10/01/2009, 2009, from <http://mortalidade.inca.gov.br/>.
- Kreukels, Baudewijntje P.C. , Schagen, Sanne B. , Ridderinkhof, K. Richard , Boogerd, Willem , Hamburger, Hans L. and Van Dam, Frits S.A.M. . Electrophysiological correlates of information processing in breast-cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94: 53-61.
- Lee, Garrick D., Longo, Dan L., Wang, Yue, Rifkind, Joseph M., Abdul-Raman, Lilanie, Mamczarz, Jacek A., Duffy, Kara B., Spangler, Edward L., Taub, Dennis D., Mattson, Mark P. and Ingram, Donald K. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12: 198-205.
- Macleod, Jill E., Deleo, Joyce A., Hickey, William F., Ahles, Tim A., Saykin, Andrew J. and Bucci, David J. Cancer chemotherapy impairs contextual but not cue-specific fear memory. *Behavioural Brain Research* 2007;181: 168-172.
- Maidana, M., Carlis, V., Galhardi, F. G., Yunes, J. S., Geracitano, L. A., Monserrat, J. M. and Barros, D. M. Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. *Chemico-Biological Interactions* 2006;159: 223-234.
- Minisini, Alessandro, Atalay, G., Bottolmley, A., Puglisi, F., Piccart, M. and Biganzoli, L. What is the effect of systemic anticancer treatment on cognitive function? *Lancet Oncol* 2004;5: 273-282.

Ministério Da Saúde, Brasil, Secretaria De Atenção À Saúde. Instituto Nacional De Câncer, Coordenação De Prevenção E Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no brasil. 2005.

Reiriz, André B., Reolon, Gustavo K., Preissler, Thales, Rosado, Joemerson O., Roesler, Rafael and Shewartsmann, Gilberto. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodentmodels: Memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. Clin Cancer Res 2006;12: 5000-5001.

Schagen, Sanne B. , Hamburger, Hans L. , Muller, Martin J. , Boogerd, Willem and Van Dam, Frits S.A.M. . Neurophysiological evaluation of late effects of adjuvant high-dose chemotherapy on cognitive function. J Neuro-Oncol 2001;51: 159-165.

Schroder, Nadja, De Lima, Maria Noemia M., Quevedo, Joao, Dal Pizzol, Felipe and Roesler, Rafael. Impairing effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on recognition memory: Possible relation to oxidative stress. Schizophrenia Research 2005;73: 377-378.

Seigers, Riejanne, Schagen, Sanne B., Beerling, Wieteke, Boogerd, Willem, Van Tellingen, Olaf, Van Dam, Frits S. A. M., Koolhaas, Jaap M. and Buwalda, Bauke. Long-lasting suppression of hippocampal cell proliferation and impaired cognitive performance by methotrexate in the rat. Behavioural Brain Research 2008;186: 168-175.

Silverman, Daniel H. S. , Dy, Christine J. , Castellon, Steven A. , Lai, Jasmine, Pio, Betty S. , Abraham, Laura , Waddell, Kari , Petersen, Laura, Phelps, Michael E. and Ganz, Patricia A. . Altered frontocortical, cerebellar, and basal ganglia activity in adjuvant-treated breast cancer survivors 5–10 years after chemotherapy. Breast Cancer Res Treat 2006;Published Online Sept 29: doi:10.1007/s10549-006-9380-z.

Tannock, Ian F., Ahles, Tim A., Ganz, Patricia A. and Van Dam, Frits S. Cognitive impairment associated with chemotherapy for cancer: Report of a workshop. J Clin Oncol 2004;22: 2233-2239.

Tchen, Nadine, Juffs, Helen G., Downie, Fiona P., Yi, Qi-Long, Hu, Hanxian, Chemerynsky, Irene, Clemons, Mark, Crump, Michael, Goss, Paul E., Warr, David, Tweedale, Mary E. and Tannock, Ian F. Cognitive function, fatigue, and menopausal symptoms in women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21: 4175-4183.

Van Dam, Frits S. A. M. , Schagen, Sanne B. , Muller, Martin J. , Boogerd, Willem , Wall, Elsken V.D., Fortuyn, Maria E. Droogleever and Rodenhuis, Sjoerd 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: 210-8.

Winocur, Gordon, Vardy, Janette, Binns, Malcolm A., Kerr, Leslie and Tannock, Ian. The effects of the anti-cancer drugs, methotrexate and 5-fluorouracil, on cognitive function in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2006;85: 66-75.

## 6. Artigo Científico em Inglês.

(Pharmacology, Biochemistry and Behaviour 2009; 94 (2): 239-243)

### **Systemic administration of doxorubicin impairs aversively motivated memory in rats**

Pedro Emanuel Rubini Liedke <sup>a, b, \*</sup>, Gustavo Kellermann Reolon <sup>c, d</sup>, Bruno Kilpp <sup>c, d</sup>, Algemir Lunardi Brunetto <sup>d, e, f</sup>, Rafael Roesler <sup>c, d</sup> and Gilberto Schwartzmann <sup>a, b, d, g</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400, 2º andar, 90035-903, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Serviço de Oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, zona 11, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, 90046-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Laboratório de Pesquisas em Câncer, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup> Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 3º andar leste, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>f</sup> Serviço de Oncologia Pediátrica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 3º andar leste, 90035-903, Porto Alegre, Brazil

<sup>g</sup> Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 700, 90035-903, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author: Tel.: + 55 51 3359-8335, Fax: + 55 51 3388- 2877. Address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, zona 11, 90035-903, Porto Alegre, Brazil. *E-mail address:* [pedroliedke@hotmail.com](mailto:pedroliedke@hotmail.com).

## **Abstract**

There is growing clinical evidence of cognitive impairment in cancer patients treated with chemotherapy, especially in women treated with drug combinations for breast cancer. Clinical studies have a difficult task of defining which drugs individually are responsible for the cognitive changes and published papers evaluating single agents in experimental models are scanty. In the present study we have investigated the effect of single escalating doses of doxorubicin (DOX) on memory for inhibitory avoidance conditioning (IA) in rats. The doses used were comparable to those applied in the clinic. When given systemically before training, higher doses of DOX impaired IA memory retention measured 24 h and 7 days, but not 3 h after training. DOX did not affect IA retention when given either before or after training in a multiple-trial IA training protocol. Control experiments showed that DOX produced a decrease in exploratory behavior assessed by the number of rearings performed during exploration of an open field. The results indicate that a single systemic administration of DOX might impair long-term aversive learning.

## ***Keywords***

chemo-brain, chemo-fog, doxorubicin, memory, cognitive impairment, inhibitory avoidance, hippocampus, amygdala, rats.

## **1. Introduction**

Cognitive impairment has been described in patients receiving combination chemotherapy, especially in women with breast cancer (Ahles et al., 2002; Brezden et al., 2000; Falletti et al., 2005; Fan et al., 2005; Schagen et al., 2001b; Silverman et al., 2006; Tchen et al., 2003; Van Dam et al., 1998). Acute cognitive changes during chemotherapy are common and a subgroup of patients will remain with long term post-treatment cognitive impairment (Ahles et al., 2007). These effects of chemotherapy are commonly referred to as “chemo-brain” or “chemo-fog” (Tannock et al., 2004).

Although the actual mechanisms of cognitive impairment are unknown, many hypothesis have been postulated, such as reductions in estrogen and testosterone levels, rupture of the blood-brain barrier, cytokine deregulation, DNA damage, telomere shortening and genetic susceptibility (Ahles et al., 2007). Since these possible mechanisms are difficult to evaluate clinically, there has been a growing interest in investigation through animal models of cognitive performance (Lee et al., 2006; MacLeod et al., 2007b; Reiriz et al., 2006; Seigers et al., 2008b; Winocur et al., 2006b). These experimental studies have used rodent models, in which animals were exposed to single or multiple administrations of cytotoxic drugs. Learning capacity of these animals after chemotherapy has been tested through the use of the Morris water maze (Lee et al., 2006; Seigers et al., 2008b; Winocur et al., 2006b), Stone 14-unit T-maze (Lee et al., 2006), inhibitory avoidance (IA) (Reiriz et al., 2006) and fear conditioning (MacLeod et al., 2007b). Few drugs have been studied in these experiments, mostly combinations that included 5-fluorouracil (Lee et al., 2006; Winocur et al., 2006b), methotrexate (Seigers et al., 2008b; Winocur et al., 2006b) and cyclophosphamide (MacLeod et al., 2007b). Doxorubicin (DOX) was evaluated in only one study and in combination with cyclophosphamide (MacLeod et al., 2007b). In our laboratory, a memory impairment was demonstrated in male rats with the administration of single-agent cyclophosphamide in rats (Reiriz et al., 2006).

Since cancer patients are usually treated with combination chemotherapy, clinical studies are rarely capable to define the contribution of each individual drug in the induction of cognitive changes. In this study, we investigated the effect of DOX, one of the most commonly used chemotherapeutic agents in the clinic, in a rodent model of emotionally motivated memory.

## **2. Methods**

### *2.1 Animals*

One hundred and twelve adult male Wistar rats (2 to 3 months old; 180-350 g at the time of the experiment) obtained from the Department of Pharmacology of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, were housed five to a cage with food and water available ad libitum, and maintained on a 12 h light/dark cycle. Behavioral procedures were performed during light hours. All experimental procedures were approved by the institutional animal care committee and 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 Experimental Groups*

Four distinct experiments were done with four different groups of animals: In the first experiment, animals received DOX or vehicle systemically before single IA training and were tested 3h, 24h and 7 days after training. In order to control for permanent impairments induced by the drug treatment, animals were retrained immediately after the 7-day retention test trial and tested 3h and 24 h later. In the second experiment, animals received DOX or



vehicle systemically after single IA training and were tested 3h, 24h and 7 days after training. In the third experiment, animals received DOX or vehicle systemically before multi-trial IA training and tested 24h later. Group 4, animals received DOX or vehicle systemically before open field and 24h later were re-exposed to the same open field arena.

### *2.3 Behavioral Procedures*

We used the single-trial step-down inhibitory avoidance (IA) conditioning as an established model of fear-motivated, hippocampus-dependent memory (Izquierdo and Medina, 1997; Taubenfeld et al., 1999). In IA training, animals learn to associate a location in the training apparatus with an aversive stimulus (footshock). The IA behavioral training and retention test procedures were described in previous reports (Quevedo et al., 2004). The IA apparatus was a 50 cm×25cm×25 cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1mm 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. On the training trial, rats were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. Immediately after stepping down on the grid, rats received a 0.5 mA, 2.0 s foot shock and were removed from the apparatus immediately after the foot shock. The retention test trials were procedurally identical to training, except that no foot shock was presented. Step-down latencies on the retention test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA retention.

Multi-trial repeated acquisition (Bianchin et al., 2000) was done in the same IA apparatus described above. Animals were placed in the platform and received 0.5 mA, 2.0 s foot shock immediately after stepping down. Animals were then once more placed on the platform and the foot shock was once again administered if the animal stepped down on the metal grid. This procedure was repeated until the animals remained in the platform for 180 s.

Open field behavior was performed as previously described (Picada et al., 2002) to examine possible drug-induced alterations in locomotor activity, exploration, and anxiety (Henderson et al., 2004). The open-field was a 20 x 30 cm arena, surrounded by 50 cm high walls, made of brown plywood with a frontal glass wall. The floor of the open field was divided into 12 equal squares by black lines. Rats were put in the apparatus, placed on its left rear quadrant, and left to freely explore the arena for 5 min. Crossings of the black lines, rearings performed, latency to start locomotion, and the number of fecal bolus during exploration were counted. The number of crossings was used as a measure of locomotor activity, the number of rearings as a measure of exploratory behavior, and the latency to initiate locomotion and the number of fecal bolus were used as measures of anxiety. Animals were re-exposed to the same environment 24 h after the first evaluation.

#### *2.4 Drug treatment*

Animals received DOX (Zodiac, Brazil; Bergamo, Brazil) by intra-peritoneal route in one bolus dose. The reference dose of 8 mg/kg was chosen because it is roughly equivalent to the human dose of 60 mg/m<sup>2</sup> (FDA 2007). Two other lower dosages were used: 0.5 mg/kg and 2 mg/kg to determine a possible dosage response curve. When used in pre-training IA experiment, the drug was administered between twenty and thirty minutes before training. When used in the pre-test trial, the drug was administered between twenty and thirty minutes before the 3 h memory retention trial. In the multi-trial repeated acquisition, DOX was administered before training, as in the pre-training experiment. In the open-field task, the animals also received the drug twenty minutes before exploratory behavior evaluation. Control animals received sodium chloride 0.9% in the same manner as DOX.

#### *2.5 Statistical analysis*

All data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE). Comparisons between multiple dosage groups and controls were done using Kruskal-Wallis analysis of variance, followed, when necessary, by two-tailed Mann-Whitney U-test. Comparisons between groups in the multi-trial repeated acquisition was done by two-tailed Mann-Whitney U-test. Open-field results were analyzed by Student's T test for independent groups. All results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

The results of the pre-training IA trial can be seen in Figure 1. There was no difference between groups in the 3 h retention test ( $p=0.14$ ). In the 24 h retention test there was a statistically significant difference between controls and the 2.0 mg/kg and 8.0 mg/kg dosage groups ( $p=0.022$  and  $p=0.004$ , respectively). This difference was also seen 7 days after training ( $p=0.01$  and  $p=0.004$ , for 2.0 mg/kg and 8.0 mg/kg groups, respectively). No difference was observed for the 0.5 mg/kg group in these trials ( $p=0.08$  and  $p=0.16$ , respectively). There was also no difference between groups during training and in the retraining trial (data not shown). In the pre-testing trial there were no differences between groups during training and in the 3 h, 24 h and 7 day tests (Figure 2).

Multi-trial repeated acquisition was done only with the 8 mg/kg dosage ( $n=9$ ) and placebo ( $n=9$ ). There were no differences in comparison with controls in respect to latency of the first step-down from the platform ( $p=0.76$ ), the number of trainings ( $p=0.29$ ) or retention testing after 24 h ( $p=0.45$ ).

The open-field trial was also performed only with the 8 mg/kg dosage and placebo. There was no difference between this group and the control in the training with respect to latency to initiate locomotion, the number of crossings and rearings and the number of fecal bolus (data not shown). Twenty four hours after the first exposure to the open-field

environment there was a difference between the groups in respect to the number of rearings ( $p=0.004$ ) with the mean number of rearings being smaller in the DOX group (Figure 3). There was no difference in respect to latency to initiate locomotion, crossings or fecal bolus.

There were no significant changes between groups in weight 7 days after injection, although animals that received 8 mg/kg of DOX had a trend of losing more weight (data not shown).

#### **4. Discussion**

We have conducted an experimental trial in a rodent model of IA, an emotionally motivated memory dependent on the hippocampus and amygdala. In this experiment administration of a single dose of DOX before training impaired the animals' learning capacity 1 and 7 days after training, while the results of testing 3 hours after training were not altered in comparison to the controls. The long term memory effect was observed in the groups that received 2 mg/kg and 8 mg/kg, but not in the group that received 0.5 mg/kg of the drug suggesting a dose dependent response. When these animals were retrained 1 week after the administration of DOX they were able to learn not to descend from the platform. The ability of retaining memory 3 hours but not 24 hours and 7 days after training suggests that DOX interfered with long-term memory, sparing short term memory. This effect was reversible, since animals were able to learn one week after administration, indicating that a single dose of DOX does not cause permanent damage. When the animals were exposed to multiple training there was no effect of the drug on long-term memory, indicating that exposure to multiple stimuli overcame the inhibitory effect of a single dose of DOX in memory acquisition. No effect was observed when the drug was administered pre-testing, independently of the dosage used. This suggests that there is no interference of a single dose of DOX in short or long-term memory consolidation.

When the animals were evaluated in the open field twenty minutes after DOX, no difference in comparison to controls was observed in the first day in respect to latency to start locomotion, crossings, rearings and number of fecal bolus, which indicates no differences in anxiety, locomotive capacity and exploratory behavior. When tested 24 hours after receiving DOX the only difference observed was in respect to the number of rearings, more common in the saline group, suggesting that DOX interfered with the exploratory behavior. This effect, however, corroborates the results of the pre-training IA experiment, since even having a decreased exploratory behavior the animals that received DOX still had a lower latency to descend from the platform onto the electrified grid in comparison to controls.

Other animal models have been used to investigate the effect of chemotherapeutics in memory and learning capacity. Winocur et al (2006) have tested the combination of 5-fluorouracil and methotrexate administered in weekly doses, during three consecutive weeks. The results of this study demonstrated that the combination of 5-fluorouracil and methotrexate caused deficits in spatial memory, in conditional rule learning on the non-mach to sample test, and on the longest delay on the delayed non-mach to sample test. These results suggest alteration in hippocampal and frontal lobe function after using the combination of these drugs. Although in our experiment we used only a single dose of DOX, our results also suggest that there was impairment of hippocampal function, possibly by a similar mechanism of alteration of memory acquisition. In their study, Winocur et al discuss that the possible effects of the drugs on the spatial memory test were due to performance-related variables. We controlled our experiment using the open-field for evaluation of anxiety and exploratory behavior and found a difference in exploratory behavior for the drug group 1 day after administration. In contrast to the use of the Morris water maze, where the animals have to actively find the safety of the hidden platform, in IA the animals are placed directly on the safe platform and, driven by their natural behavior, tend to explore the environment. In this case, we would expect that animals with lower exploratory behavior would have a longer latency to descend

onto the electrified grid. This, however, was not the case in our experiment, and even with lower exploratory behavior the latency of animals that received DOX was lower than that of controls, suggesting that these animals learned not to descend, while those of the drug group did not.

Methotrexate was also tested by Seigers et al (2008). These authors used a high dose of methotrexate and found that the treated animals had a longer latency to cross the platform area in the Morris water maze test. Animals that received chemotherapy also showed a different response in the novel object recognition.

In another study by our group, Reiriz et al (2006) performed a similar approach as in this study using cyclophosphamide. They also found memory impairment one day after training in the IA apparatus, although no effect was seen one week after. In this experiment no differences were seen on the open-field evaluation.

Lee et al (2006) examined the effects of cyclophosphamide or 5-fluorouracil in 7 and 18 month old rats after administration every 4 weeks for 12 weeks, followed by a last administration after 6 weeks. Testing in this study was conducted 7 weeks after recovery from the last drug administration. Interestingly, and on the contrary of the above, there was an enhanced performance in the young female rats in the Stone 14-unit T-maze and in the Morris Water maze. This effect was no longer seen 42 weeks after recovery. Amongst the older rats no differences were observed. In this study synaptic plasticity of hippocampal slices of animals receiving cyclophosphamide was also analyzed and a decreased LTP was observed after four cyclophosphamide cycles in comparison to controls. In contrast, a higher LTP was seen 8 weeks after the last cycle and remained enhanced, although less in magnitude, 53 weeks after the last cycle. The contrasting results of this study might be explained by the moment in which the animals were tested, since Lee et al waited 7 weeks to start testing, while our experiment and the other studies mentioned above started testing within a week

after chemotherapy. This would be in accordance to Lee's finding of an initially decreased LTP, followed by an enhancement 8 weeks after chemotherapy.

In a study by MacLeod et al (2007), a combination of DOX and cyclophosphamide was used to test the response to fear conditioning of female ovariectomized rats. In their experiment, rats treated with chemotherapy had a diminished response to contextual fear, but not in the cued memory test one week after the last of three doses of active drugs. Contextual fear resembles the testing of IA and their results are similar to ours and reinforce the occurrence of hippocampal dysfunction caused by chemotherapy. We also found no difference when animals were retrained one week after chemotherapy (Figure 2).

Interestingly, our study did not show influence of DOX on memory after training, which indicates that this drug, on a single time point, does not influence memory consolidation, only acquisition. To our knowledge, no other studies investigating the effects of chemotherapeutics on memory consolidation have been published to date.

Although DOX is known not to penetrate the blood-brain barrier (BBB), part of its cytotoxic effects are mediated by free radical formation, lipid peroxidation, chelation of iron and formation of reactive oxygen species, resulting in oxidative stress (Danesi et al., 2002). Alteration in hippocampal oxidative stress has been related to memory impairment caused by other drugs such as haloperidol and clozapine (Schroder et al., 2005) and toxins such as microcystines (Maidana et al., 2006), thus reactive oxygen species and induction of oxidative stress might be an indirect mechanism through which DOX causes memory impairment. This will be subject of further studies by our group.

In conclusion, we have demonstrated in this experimental model that DOX in a single administration, in doses equivalent to those applied in the clinic, produces a reversible impairment in memory acquisition, but not in memory consolidation in Wistar rats.

## **5. Acknowledgements**

This research was supported by CNPq grant number 477775/2006-3 to R.R., the Children's Cancer Institute (ICI-RS, Porto Alegre), and the South American Office for Anticancer Drug Development (Porto Alegre). We wish to thank Mr. Wilson de Nicola Junior and Medhisul, Porto Alegre, RS, Brazil, for donating the study drug and Dr Adalberto Broecker Neto and Oncologia Centenário, São Leopoldo, RS, Brazil, for technical support in drug preparation. The authors indicate no conflict of interest.



## References

- Ahles TA, Saykin AJ. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. *Nat Rev Cancer* 2007;7: 192-201.
- Ahles TA, Saykin AJ, Furstenberg CT, Cole B, Mott LA, Skalla K, et al. Neuropsychologic impact of standard-dose systemic chemotherapy in long-term survivors of breast cancer and lymphoma. *J Clin Oncol* 2002;20: 485-493.
- Bianchin MM, Spanis CW, Roesler R, McGaugh JL, Izquierdo I. (+/-)-Alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine, a metabotropic glutamate receptor blocker, impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats when infused into the basolateral nucleus of the amygdala. *Brain Res* 2000;852: 436-443.
- Brezden CB, Phillips K-A, Abdoell M, Bunston T, Tannock IF. Cognitive function in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18: 2695-2701.
- Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte PA, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* 2002;41: 431-444.
- Falletti MG, Sanfilippo A, Maruff P, Weih L, Phillips K-A. The nature and severity of cognitive impairment associated with adjuvant chemotherapy in women with breast cancer: A meta-analysis of the current literature. *Brain Cogn* 2005;59: 60-70.
- Fan HGM, Houede-Tchen N, Yi Q-L, Chemerynsky I, Downie FP, Sabate K, 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.
- Food and Drug Administration. (2007). "FDA dose calculator." *Oncology Tools* Retrieved 12/10/2007, 2007, from <http://www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm>.
- Henderson ND, Turri MG, DeFries JC, Flint J. QTL analysis of multiple behavioral measures of anxiety in mice. *Behav Genet* 2004; 34: 267-293.
- Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 2006;68: 285-316.
- Lee GD, Longo DL, Wang Y, Rifkind JM, Abdul-Raman L, Mamczarz JA, et al. Transient improvement in cognitive function and synaptic plasticity in rats following cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12: 198-205.
- MacLeod JE, DeLeo JA, Hickey WF, Ahles TA, Saykin AJ, Bucci DJ. Cancer chemotherapy impairs contextual but not cue-specific fear memory. *Behav Brain Res* 2007;181: 168-172.
- Maidana M, Carlis V, Galhardi FG, Yunes JS, Geracitano LA, Monserrat JM, et al. Effects of microcystins over short- and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats. *Chemico Biol Interact* 2006;159: 223-234.
- Picada JN, Schröder N, Izquierdo I, Henriques JA, Roesler R. Differential neurobehavioral deficits induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in rats. *Eur J Pharmacol* 2002;443: 105-111.
- Quevedo J, Vianna MR, Martins MR, Barichello T, Medina JH, Roesler R, et al. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav Brain Res* 2004;154: 339-343.
- Reiriz AB, Reolon GK, Preissler T, Rosado JO, Roesler R, Schwartsmann G. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: Memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. *Clin Cancer Res* 2006;12: 5000-5001.
- Schagen SB, Hamburger HL, Muller MJ, Boogerd W, van Dam FSAM. Neurophysiological evaluation of late effects of adjuvant high-dose chemotherapy on cognitive function. *J Neurooncol* 2001;51: 159-165.
- Schroder N, de Lima MNM, Quevedo J, Dal Pizzol F, Roesler R. Impairing effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on recognition memory: Possible relation to oxidative stress. *Schizophr Res* 2005;73: 377-378.

- Seigers R, Schagen SB, Beerling W, Boogerd W, van Tellingen O, van Dam FSAM, et al. Long-lasting suppression of hippocampal cell proliferation and impaired cognitive performance by methotrexate in the rat. *Behav Brain Res* 2008;186: 168-175.
- Silverman DHS, Dy CJ, Castellon SA, Lai J, Pio BS, Abraham L, et al. Altered frontocortical, cerebellar, and basal ganglia activity in adjuvant-treated breast cancer survivors 5–10 years after chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2006;Published Online Sept 29: doi:10.1007/s10549-006-9380-z.
- 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: 2233-2239.
- Taubenfeld SM, Wiig KA, Bear MF, Alberini CM. A molecular correlate of memory and amnesia in the hippocampus. *Nat Neurosci* 1999;2: 309-310.
- Tchen N, Juffs HG, Downie FP, Yi Q-L, Hu H, Chemerynsky I, et al. Cognitive function, fatigue, and menopausal symptoms in women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21: 4175-4183.
- Van Dam FSAM, Schagen SB, Muller MJ, Boogerd W, Wall Evd, Fortuyn MED, 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: 210-8.
- Winocur G, Vardy J, Binns MA, Kerr L, Tannock I. The effects of the anti-cancer drugs, methotrexate and 5-fluorouracil, on cognitive function in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85: 66-75.

Figure 1. Pre-training IA trial demonstrating differences in latency to descend from platform in the 24 h and 7 day retention tests. Differences were observed only for the higher dose concentrations when compared to controls. Vehicle (VEH); Doxorubicin (DOX). \* p=0.022; \*\* p=0.004; \*\*\* p=0.01; \*\*\*\* p=0.004

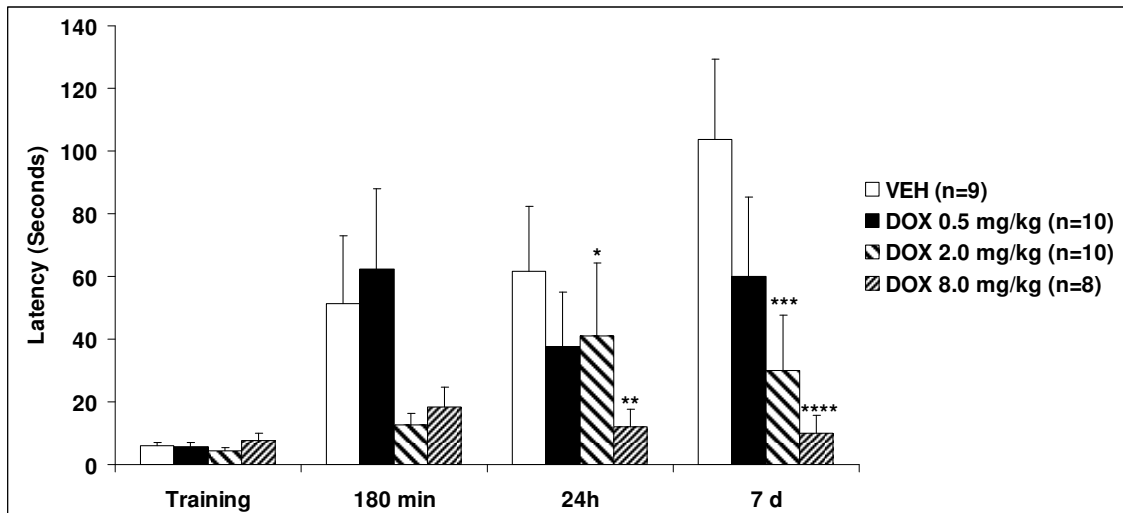


Figure 2. Pre-testing IA trial. There was no difference between groups in latency to descend from platform. Vehicle (VEH); Doxorubicin (DOX).

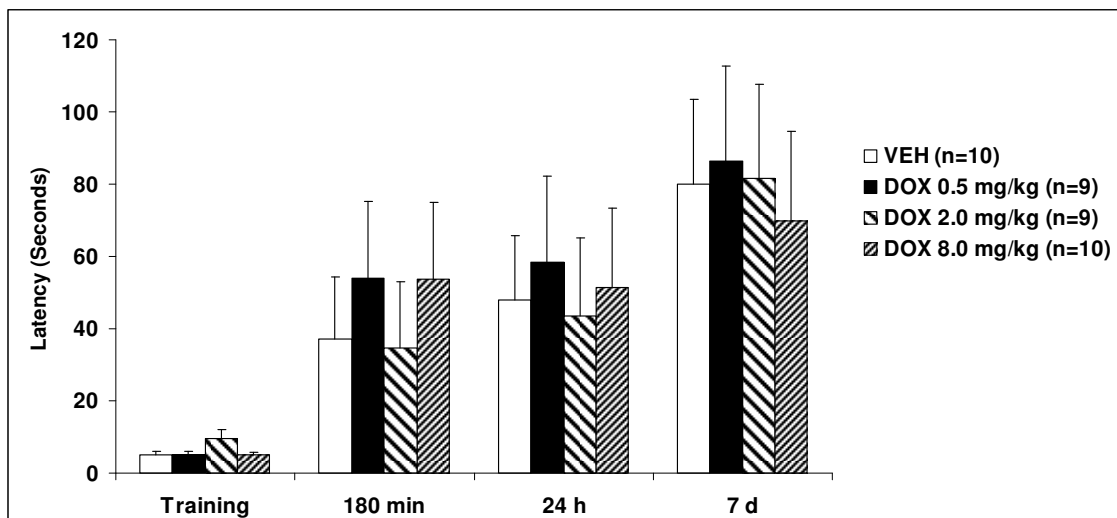
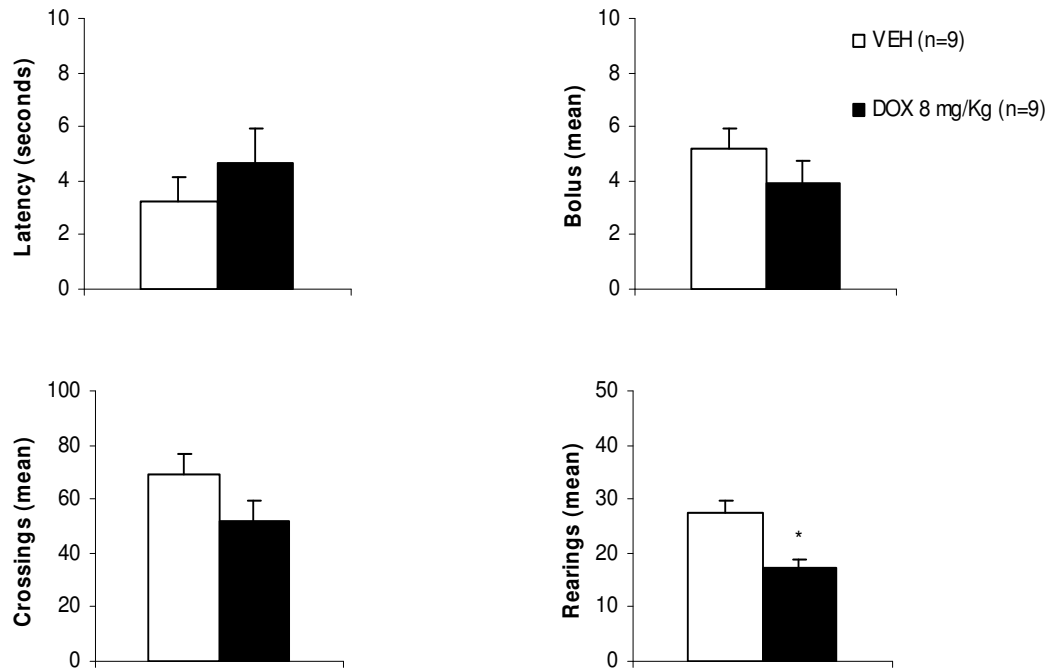


Figure 3. Open Field testing 24 h after injection. There was no difference between groups in the latency to initiate locomotion, the number of crossings and the number of fecal bolus, only for the number of rearings. Vehicle (VEH); Doxorubicin (DOX). \* p=0.004 compared to control.



## 6. Considerações Gerais

A comunidade científica tem apresentado crescente interesse em investigar a ocorrência de alterações na função cognitiva de pacientes submetidos à quimioterapia sistêmica para câncer. Frente às dificuldades na realização e interpretação de estudos clínicos, modelos experimentais têm sido desejados para avaliar os mecanismos pelos quais estas alterações ocorrem. Neste estudo foi investigado o efeito da doxorrubicina, um quimioterápico comumente utilizado na prática clínica, na memória aversiva de ratos Wistar através de teste de esQUIVA inibitória, uma prova dependente da função do hipocampo e da amígdala.

No primeiro experimento, os animais, divididos em grupos, receberam doses crescentes de doxorrubicina (0,5 mg/Kg, 2,0 mg/Kg e 8,0 mg/Kg) ou veículo e após foram submetidos a treino em um aparato de esQUIVA inibitória contendo plataforma e grade eletrificada. Neste experimento houve uma curva dose resposta onde os animais dos grupos que receberam doses mais altas de doxorrubicina (2,0 e 8,0 mg/Kg) apresentaram uma menor latência para a descida da plataforma quando avaliados 1 dia e 7 dias após o treino (figura 1 do artigo). Não houve diferença entre os grupos quando os animais foram testados 3 horas após o treino, sugerindo interferência da doxorrubicina na memória de longo prazo, mas não na de curto prazo. Ao serem re-treinados 7 dias após o treino inicial, todos os animais foram capazes de aprender a não descer da plataforma, demonstrando que o efeito sobre a memória e o aprendizado foi reversível.

Em um segundo experimento animais divididos nos mesmos grupos de doses de doxorrubicina ou placebo foram inicialmente treinados e após receberam a injeção. Neste experimento não se evidenciou diferenças entre os tempos de latência dos grupos para descer da plataforma em nenhum dos momentos de teste (3h, 1 dia e 7 dias) (figura 2 do artigo). Este

resultado sugere que não houve interferência da administração da doxorubicina na consolidação da memória de curta ou longa duração destes animais.

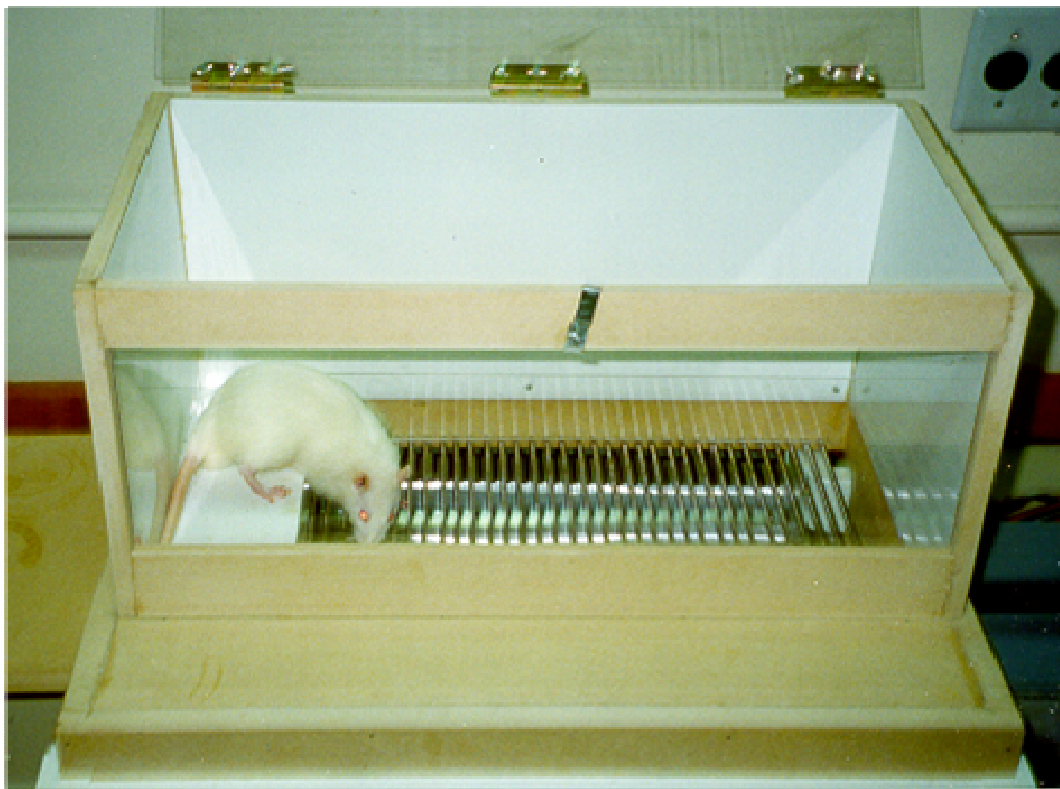
Em outra experimentação, um grupo de animais que recebeu doxorubicina na dose de 8,0 mg/Kg pré-treino foi comparado a um grupo que recebeu placebo em relação ao efeito de múltiplos treinamentos na retenção de memória de 3 e 24 horas. Não houve diferença entre os grupos na latência para descer da plataforma, no número de treinos ou na retenção de memória após 24 horas, sugerindo que o efeito da doxorubicina na forma utilizada não alterou a retenção da memória quando os animais foram submetidos a múltiplos estímulos.

Para controlar o efeito da doxorubicina sobre a capacidade de deambulação e exploração dos animais, foi realizado um teste em um aparato de campo aberto utilizando um grupo que recebeu doxorubicina na dose de 8 mg/Kg em comparação a um grupo que recebeu placebo. Não houve diferença entre os grupos na avaliação da latência para iniciar a exploração do ambiente, o número de *rearings* e cruzamentos e no número de bolus fecais. Estes resultados sugerem que a doxorubicina não interferiu na capacidade locomotora, na ansiedade e no comportamento exploratório dos animais logo após a injeção. Ao serem reintroduzidos no campo aberto 24 horas após a injeção o grupo tratado apresentou um menor número de *rearings*, indicando uma redução no comportamento exploratório (figura 3 do artigo). Este resultado, entretanto, corrobora os resultados encontrados na esQUIVA inibitória, visto que mesmo apresentando menor comportamento exploratório, os animais que receberam doxorubicina apresentaram menor latência para descer da plataforma à grade eletrificada.

Concluimos, então, através destes experimentos, que a doxorubicina administrada em dose única em concentrações similares às utilizadas para o tratamento de pacientes com câncer, causa alteração na função do hipocampo e da amígdala, determinando diminuição na aquisição da memória de longo prazo, mas não na consolidação da memória de ratos Wistar. Este efeito é dose dependente, reversível e não ocorre na presença de múltiplos estímulos.

## 7. Anexos

### Anexo 1. Animal no aparato de esquiva inibitória.





**Anexo 2.** Animal submetido ao experimento de campo aberto (A e B)

