

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM CURCUMINA OU
RESVERATROL NA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS
MODIFICADORAS DO DNA EM MODELO DE *CHEMOBRAIN*
INDUZIDO POR DOXORRUBICINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

THALITA DE SOUSA RAMOS

SÃO PAULO

2022

UNIVERSIDADE PAULISTA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM CURCUMINA OU
RESVERATROL NA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS
MODIFICADORAS DO DNA EM MODELO DE *CHEMOBRAIN*
INDUZIDO POR DOXORRUBICINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan e coorientação do prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva.

THALITA DE SOUSA RAMOS

SÃO PAULO

2022

Ramos, Thalita de Sousa.

Avaliação do tratamento com curcumina ou resveratrol na expressão gênica das enzimas modificadoras do DNA em modelo de *chemobrain* induzido por doxorubicina / Thalita de Sousa Ramos. - 2022.

43 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva.

1. Chemobrain. 2. Epigenética. 3. Metilação do DNA.
4. Neurotoxicidade. I. Bondan, Eduardo Fernandes (orientador).
I. Silva, Rodrigo Augusto da (coorientador). III. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

THALITA DE DOUSA RAMOS

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM CURCUMINA OU
RESVERATROL NA EXPRESSÃO GÊNICA DAS ENZIMAS
MODIFICADORAS DO DNA EM MODELO DE *CHEMOBRAIN*
INDUZIDO POR DOXORRUBICINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Prof. Dr. Luciana Pugliese da Silva
Centro Universitário São Camilo

_____/_____/_____
Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Universidade Paulista - UNIP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan
Universidade Paulista - UNIP

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus amores,
Douglas, Maria Isabel e Raquel.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e capacidade para realização deste trabalho.

À minha família, Douglas Aparecido da Silva Guedes, Maria Isabel Ramos Guedes e Raquel Ramos Guedes, pelo amor, a paciência, o suporte, e a motivação de todos os dias.

Ao Professor Eduardo Fernandes Bondan pela orientação e por seus ensinamentos sobre a pesquisa científica e a neuropatologia.

Ao Professor Rodrigo Augusto da Silva pelo auxílio com as análises epigenéticas e a disposição para esclarecer-me sobre esse campo de estudos.

À colega doutoranda Carolina Vieira Cardoso, por acolher-me como participante dos seus estudos, por conceder-me e explicar-me as informações de suas primeiras pesquisas e por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP) pelo suporte financeiro.

À Universidade Paulista – UNIP, por esta feliz oportunidade.

“O intelectual não é filho de si mesmo; é filho da Idéia, da Verdade eterna, do Verbo criador e animador imanente à sua criação. Quando pensa bem, o pensador segue os caminhos de Deus; não segue sua própria quimera. Quando investiga e se debate no esforço da busca, é Jacó lutando com o anjo e ‘forte contra Deus’.”

Antonin-Dalmace Sertillanges

RESUMO

A neuroepigenética busca compreender o papel das modificações epigenéticas no funcionamento normal e na patogênese das doenças do sistema nervoso. Nesse contexto, as enzimas envolvidas no processo de metilação e desmetilação do DNA aparecem como potenciais alvos de estudo para compreender os processos de neuroinflamação e os prejuízos cognitivos consequentes do tratamento quimioterápico para o câncer, o chamado *chemobrain*. Em vista disso, este estudo tem como objetivo investigar a expressão gênica das enzimas DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2 e TET3 em ratos com disfunção cognitiva tardia induzida pela administração de doxorrubicina (DOX) na infância, tratados ou não com o polifenol natural resveratrol (RSV) ou com o pigmento curcumina (CUR), ambos com reconhecida capacidade de modulação epigenética e ação antioxidante e anti-inflamatória. Foram utilizados ratos Wistar machos, com duas semanas de idade, injetados com DOX (2,5 mg/kg/semana, via intraperitoneal - IP, durante três semanas e 0,1 mL/kg/dia de água destilada por via oral- VO), em associação ou não com RSV (10 mg/kg/dia, VO, durante o mesmo período,) ou com CUR (100 mg/kg/dia, VO, durante o mesmo período). Os animais do grupo controle receberam uma injeção de solução fisiológica a 0,9% (IP, mesmo volume) e água destilada diariamente (VO). Aos 90 dias, os encéfalos foram coletados e os hipocampus analisados. Para o estudo da expressão gênica das enzimas DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2 e TET3 foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (q-PCR). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em duplicata e normalizados em relação ao controle (atribuído valor 1). Nas análises das DNA-metiltransferases, observou-se o aumento da expressão gênica de *Dnmt1* no grupo DOX+CUR e de *Dnmt3a* no grupo DOX+RSV. A expressão gênica de *Dnmt3b* foi menor no grupo DOX, quando comparada ao CTR, e aumentada no grupo DOX+RSV em relação aos grupos DOX e DOX+CUR. Já na análise das Tet metilcitosinas dioxigenases, observou-se o aumento da expressão gênica de *Tet1* no grupo DOX+RSV em relação aos demais grupos e de *Tet2* no grupo DOX, quando comparado ao CTR, o que foi revertido apenas no grupo DOX+CUR. Por fim, notou-se o aumento da expressão gênica de *Tet3* no grupo DOX, comparado ao controle, que não foi revertido pelo RSV ou pela CUR. Os resultados, tomados em conjunto, destacam o papel da CUR como possível agente preventivo de disfunção cognitiva induzida por DOX, principalmente devido à sua capacidade de regular positivamente a expressão de *Dnmt1*, possivelmente aumentando a potenciação de longa duração no hipocampo, e de diminuir a expressão de *Tet2*, corroborando com a diminuição da resposta microglial. O RSV, por sua vez, destaca-se em sua atividade anti-inflamatória, possivelmente inibindo a astrogliose no hipocampo, por meio da regulação positiva da expressão gênica de *Dnmt3a* e *Dnmt3b* e consequente silenciamento de genes promotores de inflamação.

Palavras-chave: *chemobrain*; epigenética; metilação do DNA; neurotoxicidade.

ABSTRACT

Neuroepigenetics seeks to understand the role of epigenetic changes in the normal functioning of the nervous system and pathogenesis of its disorders. In this context, the enzymes involved in DNA methylation and demethylation appear as potential targets of study to understand the processes of neuroinflammation and the cognitive losses resulting from the chemotherapy treatment for cancer, which is referred as chemobrain. In view of this, this study aims to investigate the gene expression of the enzymes DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2 e TET3 in rats with delayed cognitive dysfunction by the administration of doxorubicin (DOX) in early childhood, treated or not with the natural polyphenol resveratrol (RSV) or with the pigment curcumin (CUR), both with recognized capacity for epigenetic modulation and antioxidant and anti-inflammatory action. We have used two-week-old male Wistar rats injected with DOX (2.5 mg/kg/week, intraperitoneally - IP, for three weeks and 0.1 mL/kg/day of distilled water orally), in association or not with RSV (10 mg/kg/day, orally, during the same period), or with CUR (100 mg/kg/day, orally, during the same period). The animals in the control group received an injection of 0.9% saline solution (IP, same volume) and daily distilled water. At 90 days, the brains were collected, and the hippocampus analyzed. To study the gene expression of the enzymes DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 E TET3, the Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (q-PCR) was used. The results were expressed as mean \pm standard deviation of 5 independent animals performed in duplicate and normalized in relation to the control (attributed value 1). In the analysis of DNA-methyltransferases, an increase in gene expression of *Dnmt1* in the DOX+CUR group and of *Dnmt3A* in the DOX+RSV group was observed. The gene expression of *Dnmt3B* was lower in the DOX group, when compared to the CTR, and increased in the DOX+RSV group compared to the DOX and DOX+CUR groups. In the analysis of TETs methylcytosine dioxygenases, an increase in gene expression of *Tet1* in the DOX+RSV group was observed in relation to the other groups and of *Tet2* in the DOX group, when compared to control, which was only reversed in the DOX+CUR group. Finally, an increase in *Tet3* gene expression was noted in the DOX group, compared to CTR, which was not reversed by RSV or CUR. The results, taken together, highlight the role of CUR as a possible preventive agent of DOX-induced cognitive dysfunction, mainly due to its ability to up-regulate *Dnmt1* expression, possibly increasing long-term potentiation in the hippocampus, and decreasing the expression of *Tet2*, corroborating the decrease in the microglial response. RSV, in turn, stands out in its anti-inflammatory activity, possibly inhibiting astrogliosis in the hippocampus, through upregulation of *Dnmt3a* and *Dnmt3b* gene expression and consequent silencing of inflammation-promoting genes.

Keywords: chemobrain; DNA methylation; epigenetics; neurotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

CA - *cornu ammonis*

CTR - Controle

CUR - Curcumina

DNMTs -DNA metiltransferases

DNMT1 - DNA-metiltransferase 1

DNMT3a - DNA-metiltransferase 3A

DNMT3b - DNA-metiltransferase 3beta

DOX - Doxorrubicina

ERG-1 - Proteína de resposta de crescimento precoce 1

EROs - Espécies reativas do oxigênio

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

GluR1 - Receptor 1 de glutamato

Iba1 - *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*

IFN - Interferon

LPS - lipopolissacarídeo

LTP - potenciação de longa duração

NF-kB - factor nuclear kappa B

PP1 - Fosfatase proteica 1

q. s. p. - quantidade suficiente para

RNA - Ácido ribonucleico

RSV - Resveratrol

SNC - Sistema nervoso central

STAT3 -*signal transducers and activators of transcription*

TETs - Enzimas da família dez-onze-translocação

TET1 - Dez-onze translocação metilcitosina dioxigenases 1

TET2 - Dez-onze translocação metilcitosina dioxigenases 2

TET3 - Dez-onze translocação metilcitosina dioxigenases 3

T4 - Tiroxina

5-meC - 5-metilcitosina

5-hmeC - 5-hidroximetilcitosina

5fC - 5-formilcitosina

5caC - 5-carboxilcitosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Quimioterapia e neurotoxicidade	13
2.2	Doxorrubicina	14
2.3	Doxorrubicina e danos ao sistema nervoso central (SNC)	16
2.4	Hipocampo, aquisição e armazenamento da memória	17
2.5	Epigenética e neuroproteção	18
2.6	Memória, aprendizagem e as enzimas de metilação do DNA	20
2.7	Resveratrol (RSV)	23
2.8	Curcumina (CUR)	25
3	OBJETIVO	27
3.1	Objetivos específicos	27
4	JUSTIFICATIVA	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	Delineamento Experimental	28
5.2	Coleta do material	28
5.3	Estudo epigenético	28
5.3.1	Extração de ácido ribonucleico (RNA) total	28
5.3.2	Síntese de DNA complementar (cDNA)	29
5.3.3	Quantificação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (q-PCR)	29
5.4	Análise estatística	30
6	RESULTADOS	31
6.1	Expressões gênicas das DNA-metiltransferases	31
6.2	Expressões gênicas das TET metilcitosinas dioxigenases	32
7	DISCUSSÃO	33
8	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Os problemas de aprendizagem e memória decorrentes do tratamento quimioterápico para o câncer são denominados *chemobrain* ou *chemofog*. Esses termos se referem a uma espécie de perda de clareza e precisão em funções mentais que exijam o trabalho da atenção, da concentração e da memória nesses pacientes (DAVIS *et al.*, 2013; KAM *et al.*, 2015).

Esses efeitos têm sido associados aos processos de neuroinflamação e ativação glial (GIBSON *et al.*, 2020). A neuroinflamação é um mecanismo protetor que ocorre dentro do encéfalo como resposta primária à lesão. No entanto, quando prolongadas, tais respostas inflamatórias podem levar à disfunção neuronal e ao comprometimento da memória (KHAN *et al.*, 2019).

Nesse contexto, um campo relativamente novo de estudos, a neuroepigenética, procura compreender até que ponto as modificações químicas do DNA e das histonas nas células nervosas podem impactar nas doenças do sistema nervoso central (SNC), pois, ao longo da vida, são os mecanismos epigenéticos que regulam as interações entre os genes e o meio-ambiente (HWANG *et al.*, 2017). Logo, quando acontece algum desequilíbrio nas marcas epigenéticas, podem aparecer problemas de saúde relacionados à tumorigênese e ao envelhecimento celular (LIU *et al.*, 2011).

Ademais, muitos estudos têm revelado que as alterações de metilação do DNA e de expressão das enzimas responsáveis por esse processo modulam de maneira dinâmica a plasticidade sináptica, a aprendizagem associativa e a formação de memória, por exemplo, memória espacial, memória de medo contextual e de reconhecimento de objeto (MILLER; SWEATT, 2007; KAAS *et al.*, 2013; MORRIS *et al.*, 2014; TUNC-OZCAN *et al.*, 2018; KONG *et al.*, 2020).

A metilação do DNA acontece no carbono na posição 5 da citosina do DNA e é um importantíssimo evento epigenético, pois desempenha papel fundamental nos processos celulares de diferenciação, proliferação e senescência, por meio da transferência de grupos metil para as citosinas nas chamadas ilhas CpG's genômicas e, dessa forma, modulando a transcrição gênica local e global (LIU *et al.*, 2011).

Esse processo é mediado pela ação das enzimas metiltransferases do DNA (DNMTs), a saber, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B. Fisiologicamente, a metilação ocorre de duas maneiras distintas, a metilação de manutenção e a metilação *de novo*, ambos

processos necessários para a manutenção da herança mitótica e os padrões de metilação específicos dos tecidos (OKANO, *et al.*, 1999).

A DNMT1 é a principal metiltransferase de manutenção, ou seja, responsável pela conservação do estado de metilação. Esta enzima reconhece as regiões metiladas na fita de DNA parental e promove o mesmo padrão na fita recém-incorporada. Já a DNMT3A e a DNMT3B são essenciais para a metilação *de novo* (OKANO *et al.*, 1999).

Atuando no sentido oposto, temos a família das metilcitosinas dioxigenases (TET1, TET2 E TET3), que, por sua vez, iniciam a desmetilação do DNA por meio uma sequência de reações de oxidação que convertem 5-metilcitosina (5-meC) em 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC), a qual é então transformada 5-formilcitosina (5-fC) e 5-carboxilcitosina (5-caC), processo que culmina na perda da base metilada e sua substituição por uma citosina não metilada (YU *et al.*, 2015; BACK *et al.*, 2020).

Isto posto, este trabalho visou a investigar os efeitos do tratamento quimioterápico com DOX, associado ou não ao resveratrol (RSV) ou à curcumina (CUR) durante a infância de ratos Wistar machos, sobre a expressão gênica das enzimas de metilação (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) e desmetilação do DNA (TET1, TET2 E TET3) no hipocampo desses animais em idade adulta, bem como a possível associação dos resultados dessa expressão com a disfunção cognitiva observada na vida adulta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Quimioterapia e neurotoxicidade

Os quimioterápicos foram relacionados com o aumento da morte celular e com a diminuição da replicação na região subventricular do hipocampo, fenômenos considerados prejudiciais para a função de memória (RAFFA, 2011).

Chemobrain ou *chemofog* são termos usados para designar problemas cognitivos e de memória que podem ocorrer durante e após tratamento quimioterápico. Muitos pesquisadores definem tal reação como uma perda de nitidez mental, já que as funções cognitivas envolvem a concentração, a orientação espacial, a atenção, a memória e a linguagem (KAM *et al.*, 2015).

A incidência dessas alterações varia de 16% a 75% dos pacientes e compromete afazeres rotineiros dos mesmos, uma vez que determinam dificuldades para o exercício de tarefas simples e para a aquisição de novas habilidades (AHLES; SYKIN, 2007; JANSEN *et al.*, 2010; ARGYRIOU *et al.*, 2011).

Diferentes estudos feitos com pacientes submetidos à quimioterapia demonstram alterações cognitivas, incluindo prejuízo de memória, disfunções verbais e visuais, déficit de atenção, diminuição da velocidade de processamento de informações, déficits de linguagem e aprendizagem, incapacidade de realizar múltiplas tarefas, limitação na capacidade de organizar informações, alteração na capacidade de orientação, diminuição da capacidade de concentração e disfunção motora (van DAM *et al.*, 1998; SCHAGEN *et al.*, 1999; JANSEN *et al.*, 2005; RAFFA *et al.*, 2006; WEFEL *et al.*, 2010).

As hipóteses para os mecanismos relacionados a esses problemas cognitivos partem do princípio de que a maioria dos quimioterápicos possuem capacidade de atravessar, mesmo em pequenas quantidades, a barreira hematoencefálica, causando morte celular. Além disso, há o dano ao DNA, já que a eficiência de muitos quimioterápicos está relacionada a esse dano, a fim de eliminar as células tumorais. Entretanto, o DNA das células normais também é afetado, podendo afetar igualmente as células do SNC (AHLES; SAYKIN, 2007).

Há ainda a indução de processo inflamatório desencadeado por citocinas, que desempenham papéis importantes no SNC, modulando as funções celulares neuronais e gliais e o metabolismo da dopamina e da serotonina. A desregulação das citocinas, devido à neuroinflamação, pode causar neurotoxicidade e está relacionada

ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, pois é estabelecido um ciclo de aumento do dano ao DNA que desencadeia a liberação adicional de citocinas. (AHLES; SAYKIN, 2007).

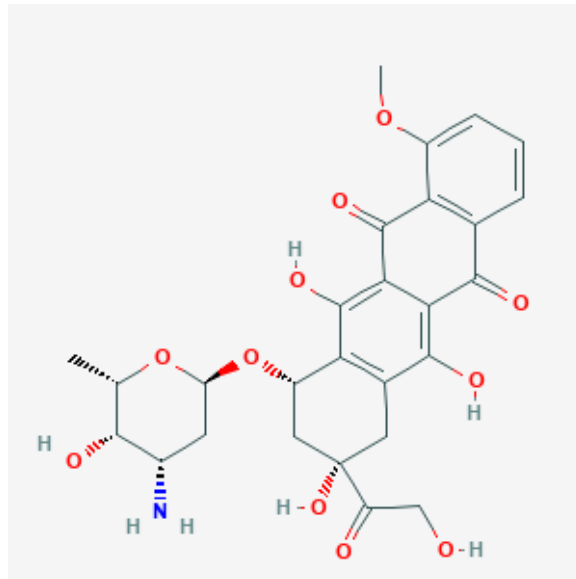
Diante desse contexto e considerando a quimioterapia como um recurso que aumenta a sobrevivência dos pacientes, há a necessidade de estudar as alterações cognitivas pós-quimioterapia, a fim de minimizar esses efeitos e permitir que médicos e equipes multidisciplinares envolvidas no tratamento do câncer possam intervir de maneira eficiente e, assim, promover uma melhor qualidade de vida ao paciente.

2.2 Doxorrubicina

Doxorrubicina (DOX) é uma antraciclina inibidora de topoisomerase II indicada para o tratamento quimioterápico adjuvante ao câncer de mama, leucemia aguda linfóide, linfoma Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, tumor de Wilms metastático, neuroblastoma metastático, sarcoma de tecido mole metastático, sarcoma ósseo metastático, carcinoma de ovário metastático, carcinoma celular da bexiga metastático, carcinoma da tireoide metastático e carcinoma gástrico metastático (FDA, 2013).

A DOX é isolada de culturas de *Streptomyces peucetius*. Quimicamente, seu nome é 5,12-naftacenediona, 10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi- α -L-lixo-hexopiranosil) oxil]-7,8,9,10-tetra-hidro-6,8,11-tri-hidroxi-8-(hidroxilacetil)-1-metoxi-, cloridrato (8S-cis) (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013). A fórmula estrutural está representada na Figura 1, a seguir.

Figura 1 – Fórmula estrutural da doxorubicina (DOX)



Fonte: PubChem (2004)

A DOX é usada por mais de 1 milhão de pacientes com câncer todos os anos, todavia, os efeitos colaterais dose-dependentes são limitadores de sua aplicação clínica. Segundo a U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2013), os efeitos colaterais dignos de atenção são cardiopatia, neoplasias malignas secundárias, necroses teciduais e mielossupressão grave.

Os mecanismos da disfunção cardíaca desencadeada pela DOX são caracterizados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), com consequente dano ao miocárdio (CAPETTA *et al.*, 2017; QIAO *et al.*, 2020). Ademais, a leucemia mieloide aguda (LMA) e a síndrome mielodisplásica (SMD) secundárias ocorrem com grande incidência em pacientes tratados com antraciclinas, incluindo o cloridrato de DOX (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2013).

São três os principais mecanismos de ação das antraciclinas. Um seria alterando a fluidez e o transporte de íons da membrana celular, formando ligações com os grupos fosfolipídicos (negativamente carregados). Outro modo de ação é a formação de ligações intercalantes entre os pares de bases da fita dupla do DNA, o que leva ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e a diminuição da atividade da topoisomerase II. Além disso, promovem a formação de EROs (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A janela quimioterápica da DOX é constituída por sua capacidade de intercalação ao DNA, causando quebra da fita dupla e interrompendo o ciclo celular em G1/G2. Uma vez que as células tumorais são replicadas rapidamente, presume-se que apresentam maior sensibilidade ao dano de DNA do que células normais (McGOWAN *et al.*, 2017; CARDOSO; BONDAN, 2018).

2.3 Doxorrubicina e danos ao sistema nervoso central (SNC)

Além dos efeitos colaterais descritos acima, a quimioterapia citotóxica está relacionada ao comprometimento cognitivo significativo em uma frequência de 17% a 33% dos pacientes submetidos a este tratamento. Essas mudanças têm uma influência grande na qualidade de vida desses pacientes, que, com constância, as descrevem como frustrantes (HUEHNCHEN *et al.*, 2020).

Os sinais da neurotoxicidade podem aparecer durante ou após o tratamento quimioterápico e podem variar de condições sutis a quadros incapacitantes. Distúrbios de atenção, memória, diminuição na velocidade de processamento das informações e déficits na função executiva são os mais comumente descritos (MANCHON *et al.*, 2016).

Embora a DOX tenha uma baixa penetração no encéfalo, parece alcançar níveis suficientes para causar neurotoxicidade (MANCHON *et al.*, 2016).

Neurônios em cultura tratados com DOX tiveram prejuízo na facilitação sináptica de longo prazo induzida por serotonina, por meio da fosforilação da p38, membro da família das proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPK), mais responsiva a estímulos de estresse (LIU *et al.*, 2014).

Em estudo realizado com neurônios corticais cultivados em meio de crescimento neuronal, o tratamento com DOX aumentou a morte neuronal, mesmo em concentrações nanomolares e aumentou as rupturas de cadeia dupla de DNA, característica envolvida na patogênese da doença de Alzheimer. Ademais, foi observada a regulação negativa da proteína BRCA1, que repara justamente as quebras da fita dupla durante o ciclo celular (BRCA1 diminuída nos neurônios causa deficiências sinápticas e déficits de aprendizagem e memória). Foi ainda observada a redução da densidade de sinapses e neuritos nos neurônios primários cultivados (MANCHON *et al.*, 2016).

Há estudos ainda que demonstram mecanismos de neurotoxicidade da DOX por meio do aumento de citocinas pró-inflamatórias e mudanças nas reações de oxirredução no SNC, o que aumenta a reatividade dos astrócitos. Nesse sentido, as pesquisas apontam que o aumento das citocinas pró-inflamatórias pode favorecer a passagem dessa antraciclina pela barreira hematoencefálica, induzindo estresse oxidativo e consequente prejuízo cognitivo (CARDOSO; BONDAN, 2018).

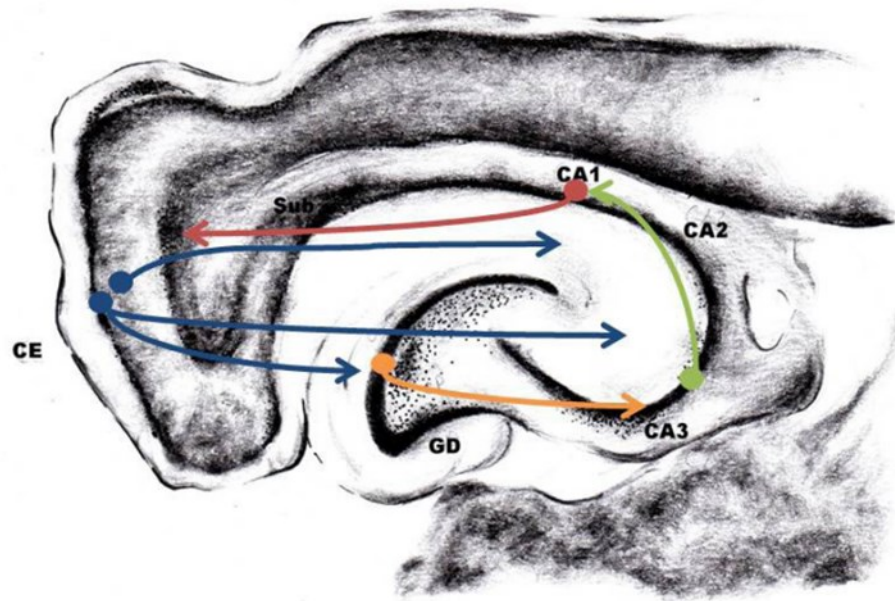
2.4 Hipocampo, aquisição e armazenamento da memória

O hipocampo é essencial para a representação espacial dos ambientes e para a lembrança de acontecimentos específicos, a chamada memória episódica, pois fornece uma estrutura espacial e temporal que nos torna capaz de relacionar experiências e criar uma espécie de “mapa cognitivo” daquilo que cada indivíduo vivencia (O’KEEFE; NADEL, 1978).

Anatomicamente, é dividido em dois principais setores interligados em forma de U, o giro dentado e o hipocampo propriamente dito (O’KEEFE; NADEL, 1978). Está localizado bilateralmente sob o lobo temporal e pertence ao sistema límbico. Em mamíferos, conta com três áreas celulares principais, chamadas giro dentado (DG), *cornu ammonis* (CA) e subículo (PIERREFICHE, 2019).

Fisiologicamente, compreende-se o hipocampo por meio de suas vias de informação (Figura 2). A principal entrada para o hipocampo vem do córtex entorrinal (EC), que fornece uma representação cortical da informação para o giro dentado. As células granulares do giro dentado realizam a separação dos padrões e se projetam para as células piramidais da região CA3, uma subdivisão do CA. Axônios de CA3 são projetados para CA1, onde acontecem as associações temporais por meio das sinapses colaterais de Schaffer. Eventualmente, as informações partem de CA1 para o subículo, que envia de volta para o córtex entorrinal (CARLSON, 2017; PIERREFICHE, 2019).

Figura 2 – Vias excitatória trissináptica



Fonte: HERNANDEZ *et al.* (2015)

2.5 Epigenética e neuroproteção

O termo epigenética foi empregado por Conrad Waddington na década de 1940 para descrever um conjunto de mecanismos que se sobrepunham à sequência de genes, de maneira que sequências idênticas podiam ser expressas diferentemente e culminar em destinos celulares diferentes. Nesse sentido, a epigenética engloba uma gama de mudanças na expressão gênica que não resultam de alterações na sequência de bases do DNA, mas em resposta às influências ambientais (HWANG *et al.*, 2017).

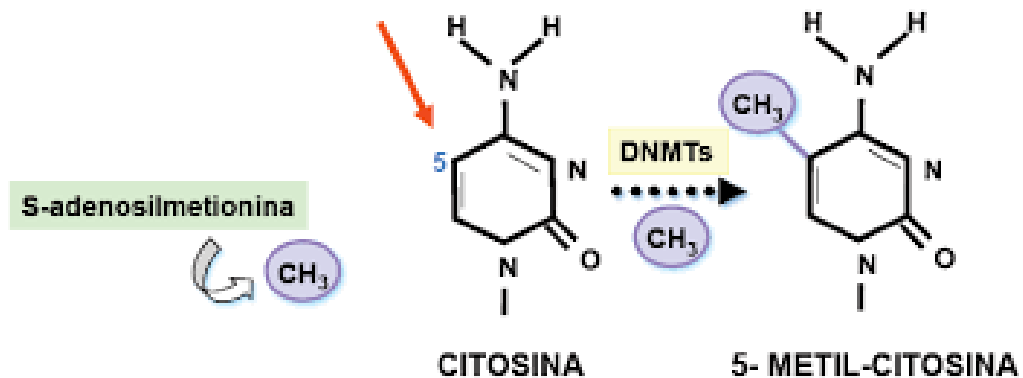
Essas mudanças, segundo o que se conhece, ocorrem devido à metilação ou hidroximetilação do DNA, modificações pós-traducionais nas histonas e remodelação da cromatina, microRNAs e RNAs não-codificantes (HWANG *et al.*, 2017).

A metilação do DNA é uma modificação química covalente catalisada por metiltransferases de DNA, as DNMTs, enzimas que reconhecem os dinucleotídeos CpG hemimetilados, depois da replicação do DNA (Figura 3). Está associada ao

silenciamento transcricional e tem sido amplamente estudada como um mecanismo de transmissão das informações epigenéticas (MILLER; SWEATT, 2007).

Em células humanas, a metilação do DNA corresponde à adição de um grupo metil (-CH₃) na posição 5' do anel da citosina nos dinucleotídeos CpG (pares Citosina-fosfato-Guanina), geralmente em regiões que controlam a expressão gênica, os promotores. Em consequência, forma-se uma barreira física nessas regiões promotoras, impedindo que sejam reconhecidas pelos fatores de transcrição (MULLER; PRADO, 2008).

Figura 3 – Metilação do DNA



Fonte: Instituto de Biociências - USP

Nesse contexto, a neuroepigenética constitui o ramo da epigenética que estuda as modificações químicas do DNA e das histonas nas células do tecido nervoso. Embora os neurônios não se dividam, os mesmos mecanismos descritos acima podem modificar o seu produto transcricional. Esses mecanismos trabalham associadamente para o armazenamento das informações no encéfalo. Portanto, problemas nesses sistemas podem prejudicar a função cognitiva básica do indivíduo (HWANG *et al.*, 2017).

2.6 Memória, aprendizagem e as enzimas de metilação do DNA

A metilação do DNA no encéfalo é essencial para aquisição e armazenamento da memória. As DNA metiltransferases DNMT1, DNMT3a e DNMT3b têm um papel importantíssimo no desenvolvimento do SNC e nas modificações dependentes das experiências na idade adulta (HWANG *et al.*, 2017).

Segundo Miller e Sweatt (2007), a inibição direta das DNMTs na região CA1 hipocampal logo após o treinamento de medo contextual bloqueou a consolidação da memória. Para elucidar melhor o porquê isso aconteceu, foram examinados os efeitos do condicionamento do medo nos níveis de metilação do gene da fosfatase proteica 1 (PP1), grupo supressor da memória. Logo após o treinamento, foi observado um grande aumento na metilação do gene *PP1*, aumentando a potenciação de longa duração. Esse silenciamento transcricional do gene *PP1* é coerente com os modelos atuais de formação de memória, em que certos genes supressores de memória devem ser silenciados para que aconteça sua consolidação (MILLER; SWEATT, 2007).

Todavia, a inibição das DNMTs na região CA1 do hipocampo bloqueou o aumento da metilação do gene *PP1*, produzida pelo condicionamento do medo, impedindo, assim, a consolidação da memória (MILLER; SWEATT, 2007).

A DNMT1 é a principal DNA metiltransferase de manutenção, que preserva os padrões de metilação do DNA e a estabilidade da metilação genômica (LIU *et al.*, 2011). Estudos em que ratos neonatos foram tratados com o inibidor de DNMT, 5-azacitidina, que inibe preferencialmente a DNMT1, no hipocampo, mostraram déficits de memória nos animais, enquanto a reversão da diminuição dessa expressão de DNMT1, utilizando T4, normalizou a memória dos mesmos animais nos testes comportamentais de medo contextual (TUNC-OZCAN *et al.*, 2018).

Em estudos realizados com camundongos machos nocautes para *Dnmt1* foram feitos testes comportamentais que pudessem sugerir prejuízos de ordem cognitiva, a saber, o labirinto de Morris, o labirinto de Barnes e o teste de labirinto radial de oito braços. Em seus resultados, obtiveram piora no desempenho cognitivo e na memória, justificados pelo declínio na metilação do DNA no encéfalo (LIU *et al.*, 2011).

Em estudos realizados por Morris *et al.* (2014), camundongos adultos nocautes para *Dnmt3a*, avaliados em tarefa de aprendizagem associativa do medo, apresentaram prejuízos na aprendizagem e na memória e no reconhecimento de objetos novos ou deslocados espacialmente. Outrossim, a indução e a manutenção

da potenciação de longa duração se apresentaram prejudicadas na região CA1 do hipocampo desses animais, indicando, assim, uma função fundamental desta enzima para a função sináptica cerebral e para a aprendizagem associativa.

Os genes envolvidos diretamente no aprendizado e na memória que podem sofrer impacto pela DNMT3a ainda são desconhecidos. Todavia, alguns trabalhos envolvendo tarefas de aprendizagem apetitosa ou aversiva demonstraram modulações na metilação de vários genes conhecidos na formação da memória, incluindo o *PP1*, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a reelina e os genes iniciais imediatos da proteína de resposta de crescimento precoce 1 (ERG-1) (MORRIS *et al.*, 2014).

Em estudo realizado por Kong *et al.* (2020), a expressão de *Dnmt3b* foi inibida especificamente em neurônios da região CA1 do hipocampo dorsal de camundongos adultos. Então, foram realizados testes comportamentais de reconhecimento de objetos e análise de expressão gênica por *microarray* seguido por q-PCR. Os animais com a deleção de *Dnmt3b* tiveram déficits no reconhecimento de local do objeto.

As metilcitosinas dioxigenases TET1, TET2 e TET3 catalisam a conversão de 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina, processo intermediário na desmetilação do DNA (HWANG *et al.*, 2017; CARRILLO-JIMENEZ *et al.*, 2019). Em camundongos, foi observado que a TET1 atua de forma atividade-dependente para ativar genes cruciais para a consolidação da memória, incluindo os que codificam para o BDNF e EGR-1 (HWANG *et al.*, 2017).

Usando o teste comportamental de condicionamento do medo, observou-se que a expressão de *Tet1* foi modulada durante a formação da memória, com significativa queda após a aprendizagem do medo condicionado. A memória contextual do medo foi avaliada uma hora e 24 horas após o treinamento, e os grupos apresentaram comportamento de congelamento semelhantes, indicando que a superexpressão de *Tet1* não teve efeito na formação da memória de curto prazo. Todavia, nos testes realizados 24 horas após o treinamento, os animais apresentaram comprometimento da memória de longo prazo (KAAS *et al.*, 2013).

A partir de seus resultados, Kaas *et al.* (2013) inferem que a superexpressão de *Tet1* no hipocampo dorsal não prejudica comportamentos gerais ou o aprendizado, todavia a memória de longo prazo é comprometida. O mecanismo suposto pelos autores é o de que o aumento da expressão dos fatores de transcrição e EGR-1 e a

ativação subsequente de seus alvos gênicos prejudicam a potenciação de longa duração.

Experimentos realizados usando camundongos machos e culturas de neurônios primários de camundongos demonstraram queda nos níveis de transcrição de *Tet1* nos neurônios em cultura após o aprendizado do medo em CA1 hipocampal, sugerindo que a repressão de *Tet1* aumenta a formação da memória do medo de longo prazo. Esses resultados apontam para *Tet1* como supressora da memória e, talvez, como uma reguladora negativa da neuroplasticidade (GREER *et al.*, 2021).

Usando camundongos injetados intraperitonealmente com lipopolissacarídeo (LPS), estudos demonstraram que a expressão de *Tet2* é regulada positivamente nas células da micróglia após estímulos inflamatórios por meio de uma via dependente de NF-κB. Além disso, regula a resposta pró-inflamatória IFN tipo I, sugerindo que a metilação do DNA poderia desempenhar papéis importantes no estado inflamatório da micróglia (CARRILLO-JIMENEZ *et al.*, 2019).

Por sua vez, a TET3 é uma metilcitosina dioxigenase que inicia a desmetilação do DNA durante a formação inicial do zigoto, a embriogênese e a diferenciação neural (YU *et al.*, 2015; BACK *et al.*, 2020;). Em estudo descritivo sobre um distúrbio mendeliano humano causado pela interrupção da desmetilação do DNA com 11 casos, observou-se que esses indivíduos, com deficiência de TET3, apresentavam fenótipo de atraso global de desenvolvimento, anormalidades craniofaciais e/ou deficiência intelectual variando de leve à grave (BACK *et al.*, 2020).

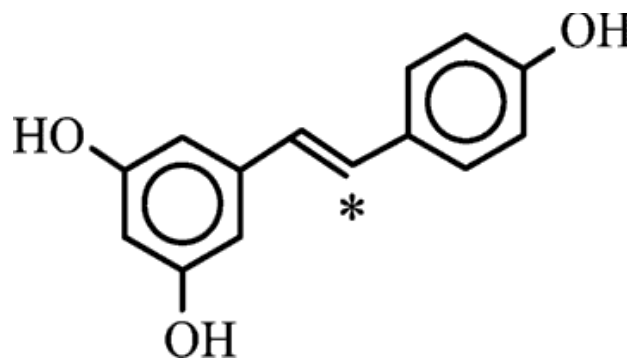
Outrossim, por meio de cultura de células hipocampais de camundongos, Yu *et al.* (2015) investigaram as funções celulares da via de desmetilação ativa do DNA mediada por TET. Concluíram que a superexpressão do domínio catalítico TET3 parece diminuir a transmissão sináptica glutamatérgica excitatória no hipocampo por meio da modulação dos níveis de GluR1, ademais, a desregulação de sua sinalização impede a homeostase da plasticidade sináptica. Assim, a TET3 funciona como um sensor de atividade sináptica (YU *et al.*, 2015).

2.7 Resveratrol (RSV)

Os polifenóis, nas plantas, estão envolvidos na defesa contra o estresse, como radiação ultravioleta, agressão por patógenos ou correntes de ar. Essa grande classe tem demonstrado potencial para inibir a neuroinflamação por meio da atenuação da ativação de vias de sinalização intracelular, como MAPK e NF- κ B (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Flavonoides, estilbenos, lignanos, ácidos fenólicos e antocianinas são alguns dos antioxidantes pertencentes a grande classe dos polifenóis. Quimicamente, são derivados da fenilalanina e possuem um anel aromático com grupo hidroxila reativo. Dentro dos estilbenos, encontramos o resveratrol (RSV) (Figura 4), que subsiste em suas duas formas isoméricas, *cis* e *trans*, sendo o isômero *trans* o mais comumente encontrado na natureza (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005).

Figura 4 - Estrutura química de resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxi-droxiestilbeno)



Fonte: WALLE (2011)

O RSV é uma fitoalexina produzida por cerca de 31 gêneros de plantas contra infecções e danos pela exposição aos raios ultravioleta. Pode ser encontrado em alguns vegetais comestíveis, como uvas, amendoim, mirtilo (e outras bagas) e ruibarbo (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005).

Após a ingestão oral, a absorção é de responsabilidade do íleo e do jejuno. Então o RSV é liberado dos enterócitos em suas formas solúveis, a saber, conjugado sulfatídeo e, em quantidade mínima, conjugado glucoronídeo. A conversão do RSV em conjugados hidrofílicos pode facilitar sua entrada na corrente sanguínea, sua difusão por todo o corpo e, o mais importante, sua excreção (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005).

Em modelo animal, a excreção renal de RSV começa horas após a ingestão e aumenta ao longo das 12-24 horas seguintes. A presença na urina de pouco RSV nativo, mas em grandes quantidades de seus conjugados, indica que o metabolismo do composto é essencial para a excreção (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005).

Voluntários saudáveis que ingeriram RSV a 0,5; 1,0; 2,5 ou 5,0 g por dia por 29 dias tiveram uma significativa diminuição na circulação do fator de crescimento insulinoide IGF-1 e da proteína de ligação de IGF 3 (IGFBP-3), em comparação com valores pré-dosagem. IGFs, que são mitogênicos e antiapoptóticos, podem afetar a diferenciação celular, a transformação neoplásica e a progressão de metástase (BROWN, *et al.*, 2010).

Outrossim, o RSV no plasma foi relacionado à inibição da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de induzir diminuição da agregação plaquetária e da ativação de leucócitos polimorfonucleares. Nas células endoteliais humanas, foi capaz de desencadear a vasodilatação e reduziu o potencial trombogênico por meio da inibição da expressão de moléculas de adesão (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005).

Como modulador epigenético, o RSV demonstrou aumentar significativamente a atividade da SIRT1 por meio de interação alostérica, aumentando a afinidade da SIRT1 tanto para NAD⁺ quanto para o substrato acetilado, com efeito positivo sobre a plasticidade sináptica e a memória (MAUGERI *et al.*, 2018).

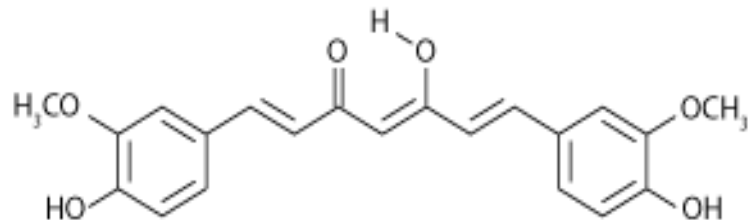
A sirtuína 1 (SIRT1) é uma histona desacetilase dependente de NAD⁺ com muitos papéis na apoptose celular, no reparo do DNA, no envelhecimento, na inflamação e no estresse oxidativo. Há evidências de que a diminuição nos níveis de SIRT1 está correlacionada com várias doenças inflamatórias (XIE *et al.*, 2013; MAUGERI *et al.*, 2018).

Ademais, foi demonstrado que os níveis de SIRT1 são reduzidos no hipocampo de ratos velhos, o que contribui para o envelhecimento cerebral e o comprometimento cognitivo. Portanto, moléculas que modulam a expressão de SIRT1 podem representar uma possibilidade de prevenção das marcas de neuroinflamação e envelhecimento (XIE *et al.*, 2013; MAUGERI *et al.*, 2018).

2.8 Curcumina (CUR)

A curcumina (CUR, diferuloilmetano) (Figura 5) é um polifenol de cor amarela do rizoma da *Curcuma longa*, conhecida também como açafrão-da-terra, gengibre amarelo e raiz-de-sol. Sobre a CUR, têm sido demonstrados muitos efeitos terapêuticos e farmacológicos antioxidantes, anti-inflamatórios, antiapoptóticos e neuroprotetores, modulando alvos moleculares importantes, relacionados inclusive à patogênese do câncer (SHEHZAD *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 2019).

Figura 5 – Estrutura química da curcumina



Fonte: NELSON *et al.* (2017)

Suas propriedades anti-inflamatórias são devidas a sua capacidade de regulação das vias ciclooxigenase e lipoxigenase, que impedem a formação de leucotrienos e prostaglandinas, importantes mediadores da inflamação. A CUR diminui também os níveis de glicose no sangue por meio da indução à maior expressão do transportador de glicose (ALIBEIKI *et al.*, 2017; PALIWAL *et al.*, 2021).

Ademais, a CUR vem sendo associada a melhores habilidades cognitivas e à redução no desenvolvimento de demência, em função de seu potencial de impedir ou reverter prejuízos na memória associadas ao envelhecimento, estresse, estresse oxidativo e lesão cerebral traumática (PALIWAL *et al.*, 2021).

Conforme Hassan *et al.* (2019), o papel da CUR como modulador epigenético por meio da metilação do DNA tem sido observado, atuando como uma possível inibidora das DNMTs e, assim, modificando o padrão de metilação do DNA. Alguns estudos sobre a expressão/supressão de genes pró-metastáticos têm demonstrado para a CUR uma importante tendência à hipometilação em estudos globais de metilação de DNA.

Outrossim, a CUR inibe a atividade da histona desacetilase (HDAC) em muitos tipos celulares. Inibidores de histona desacetilase são conhecidos por suprimir a resposta ao dano no DNA; logo a HDAC suprimida pela CUR é importante para suprimir o reparo do DNA (WANG *et al.*, 2015).

Em razão disso, a CUR, como inibidora de HDAC, pode representar um eficiente tratamento a ser associado à terapia do câncer, uma vez que o adequado reparo do DNA permite que células tumorais sobrevivam à radiação e à quimioterapia. Logo, inibidores do reparo do DNA podem potencializar o tratamento com radioterapia e quimioterapia (WANG *et al.*, 2015).

Já o efeito neuroprotetor da CUR foi testado contra EROs induzidas por LPS, neuroinflamação mediada por EROs, neurodegeneração e déficits de memória no hipocampo de ratos adultos. Em seus resultados imuno-histoquímicos e bioquímicos, a CUR inibiu o estresse oxidativo por LPS, melhorando a neuroinflamação. Além disso, a CUR melhorou o comprometimento da memória induzida por LPS no labirinto aquático de Morris e no labirinto em Y (KHAN *et al.*, 2019).

Em estudo realizado com ratos machos adultos, a administração de CUR por 28 dias (100 mg/kg) também melhorou os déficits de memória, segundo teste de reconhecimento de novo objeto, e foi capaz de restaurar a distribuição espacial normal neuronal na região CA1 após isquemia cerebral global (DOLATABADI *et al.*, 2019).

3 OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi o de analisar a possível relação entre os efeitos cognitivos e de memória de ratos adultos tratados com DOX durante a infância, em associação ou não com o RSV ou a CUR, com a expressão gênica das enzimas modificadoras do DNA no hipocampo desses animais.

3.1 Objetivos específicos

Investigar o efeito do tratamento da CUR e do RSV na expressão gênica das enzimas DNA-metiltransferases DNMT1, DNMT3a, DNMT3b no hipocampo de animais submetidos ao modelo de *chemobrain* induzido por DOX.

Investigar o efeito do tratamento da CUR e do RSV na expressão gênica das enzimas TET1, TET2 e TET3 no hipocampo de animais submetidos ao modelo de *chemobrain* induzido por DOX.

4 JUSTIFICATIVA

As alterações cognitivas associadas à quimioterapia ainda são causadoras de grandes transtornos para os pacientes submetidos ao tratamento do câncer. No entanto, ainda não existem tratamentos eficazes para os efeitos colaterais neurotóxicos dessas drogas, entre elas, a DOX. Por essa razão, busca-se compreender melhor o déficit cognitivo decorrente de sua ação neurotóxica, e encontrar possíveis meios de prevenção e/ou tratamento, como o RSV e a CUR.

Nesse contexto, a metilação do DNA é um potencial alvo de estudo para compreender a patogênese do *chemobrain*, bem como avaliar o potencial terapêutico de novas drogas, já que os processos de neuroinflamação, de estresse oxidativo e de formação e consolidação da memória dependem da ativação e do silenciamento de genes específicos. Por conseguinte, a fim de compreender como esses dois polifenóis podem prevenir as alterações cognitivas observadas e interferir nos parâmetros de neuroinflamação decorrente do uso de DOX, escolheu-se neste estudo a análise das enzimas relacionadas com a metilação do DNA.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento Experimental

O material utilizado neste estudo foi proveniente de estudo prévio aprovado no CEUA sob o protocolo 7736130319.

Nesse estudo, foram utilizados sessenta ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, de duas semanas de idade, divididos em quatro grupos (n = 15 em cada):

1. grupo DOX, constituído por ratos que receberam doxorubicina (FAULDOXO® 10 mg), por via intraperitoneal - IP, na dose semanal de 2,5 mg/kg durante 3 semanas e 0,1 mL/kg/dia de água destilada por via oral, durante o mesmo período;

2. grupo DOX+RSV, constituído por ratos que receberam DOX associada ao RSV (em solução de Tween 80 e água destilada, 5 mg/mL) por via oral na dose de 10 mg/kg, diariamente, durante o mesmo período;

3. grupo DOX+CUR, constituído por ratos que receberam DOX associada à CUR (em solução de Tween 80 e água destilada, 50 mg/mL) por via oral na dose de 100 mg/kg, diariamente, durante o mesmo período;

4. grupo controle (CTR), ratos injetados com o mesmo volume de solução salina estéril a 0,9% por via IP e 0,1 mL/kg/dia de água destilada por via oral, durante o mesmo período.

5.2 Coleta do material

No dia pós-natal (PND) 90, os animais foram eutanasiados com solução de tiopental (60 mg/kg, via IP). Dez animais de cada grupo foram submetidos à perfusão intracardíaca com formol tamponado a 10% para estudos morfológicos (não apresentados nesta dissertação) e cinco animais de cada grupo tiveram seus encéfalos coletados. As regiões correspondentes aos hipocampus foram isoladas e congeladas a -80°C para posterior avaliação epigenética.

5.3 Estudo epigenético

5.3.1 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total

O RNA total foi isolado do hipocampo utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização das estruturas em 0,5 mL do reagente TRIzol® a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL

de clorofórmio e (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) e centrifugação (14.000 rpm) Luciana pediu em g por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos devidamente identificados, sendo desprezada a fase precipitada. Em seguida, a precipitação do RNA foi realizada com adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e novamente centrifugadas (14.000 rpm) por 15 minutos. Ao término da centrifugação, o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (pellet) foi lavado com etanol 75% em água DEPC 0,1%, ressuspenso em 20 µL de água DEPC e armazenados a -80°C. A quantidade e pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

5.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total, na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 µL, contendo 500 µM de dNTP, 25 µg/mL de OLIGO dT, 1X de solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 µM de DTT, acrescido da enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover o desdobramento de possíveis estruturas secundárias e, em seguida, a reação de síntese ocorreu durante 50 minutos a 50°C, com inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação, o cDNA sintetizado foi diluído em água DEPC a concentração final de 100 ng/µl e armazenado a -20°C.

5.3.3 Quantificação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (q-PCR)

Para o estudo da expressão gênica todas as reações foram realizadas em duplicata técnica e tiveram como controle endógeno o gene β -actina, Gapdh e 18S. As reações tiveram volume final de 10 µL, contendo 5 µL de SYBR Green I Master, 0,4 µM de iniciadores específicos, 1 µL do cDNA (na concentração de 100 ng/µL)

sintetizado e q.s.p. (quantidade suficiente para) de água Milli-Q *Rnase free*. As sequências dos iniciadores, condições de reações e temperatura de anelamento foram apresentadas na Tabela 1. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo é subtraída pela média do Ct dos controles utilizados, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão substituiremos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à média da expressão gênica dos genes utilizados como normalizadores. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais independentes e normalizados em relação ao controle (atribuído valor 1).

Tabela 1. Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica

Gene (ID)	Iniciador	Condições de reação	Tamanho do fragmento	
Dnmt1 (84350)	Forward	AGG ACC CAG ACA GAG AAG CA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	201 pb
	Reverse	GTA CGG GAA TGC TGA GTG GT		
Dnmt3A (444984)	Forward	AGG AAG CCC ATC CGG GTG CTA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	225 pb
	Reverse	AGC GGT CCA CTT GGA TGC CC		
Dnmt3B (444985)	Forward	TCG ACT TGG TGG TTA TTG TCT G	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	129 pb
	Reverse	TCG AGC TAC AAG ACT GCT TGG		
Tet1 (309902)	Forward	GCC CCT CTT CAT TAC CAA GTC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	211 pb
	Reverse	CGC CAG TTG CTT ATC AAA ATC		
Tet2 (310859)	Forward	GGT GCC TCT GGA GTG ACT GT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	245 pb
	Reverse	GGA AAA TGC AAG CCC TAT GA		
Tet3 (680576)	Forward	GGC CAG GTC CTG AAA GCT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	198 pb
	Reverse	CGC CTC ACA GGA GAC AAT C		

5.4 Análise estatística

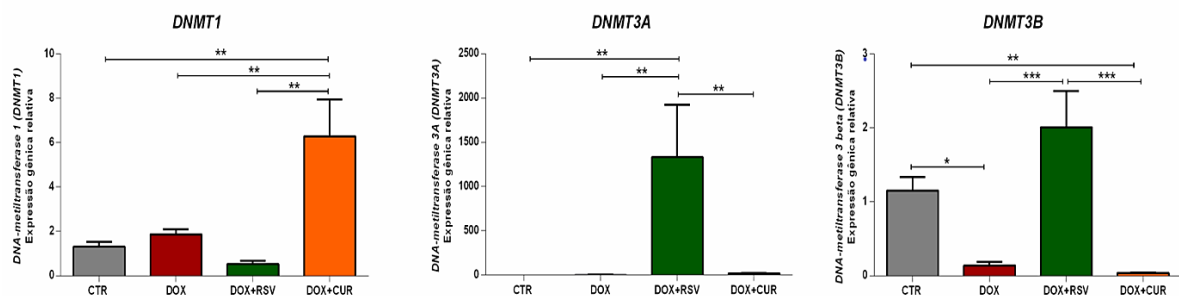
A homoscedasticidade foi verificada usando um F-teste, ou de Bartlett e a normalidade, com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação dos dados entre grupos foi realizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Expressões gênicas das DNA-metiltransferases

Nossos resultados mostraram que a expressão gênica para a DNA-metiltransferase 1 (*Dnmt1*) foi maior nos animais pertencentes ao grupo DOX+CUR quando comparada aos animais dos demais grupos ($p < 0,01$). Para a DNA-metiltransferase 3A (*Dnmt3a*) a expressão foi maior nos animais do grupo DOX+RSV em comparação aos animais dos demais grupos ($p < 0,01$). Já *Dnmt3b* teve maior expressão também nos animais pertencentes ao grupo DOX+RSV, quando comparado aos animais dos grupos DOX e DOX+CUR ($p < 0,001$), e os animais pertencentes ao grupo DOX e DOX+CUR apresentaram uma menor expressão quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 6).

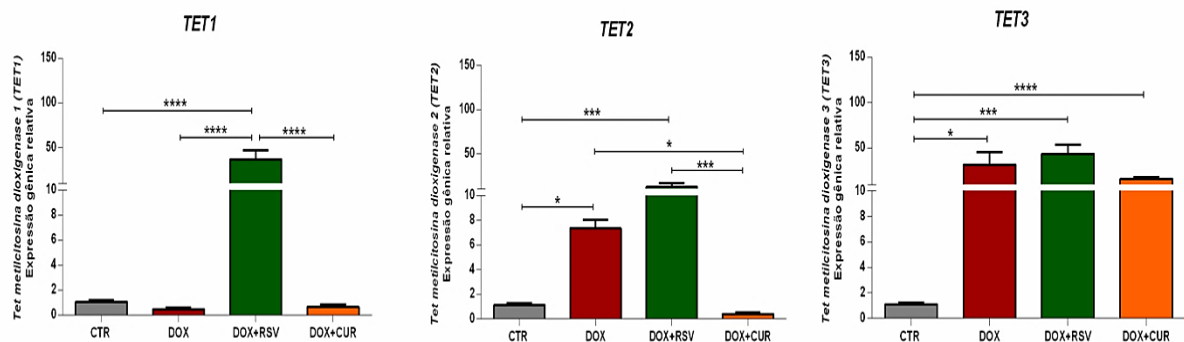
Figura 6 – Efeito da DOX, associada ou não ao RSV ou à CUR sobre a expressão gênica das enzimas DNA-metiltransferases (*Dnmt1*, *Dnmt3a* e *Dnmt3b*). Os níveis de mRNA foram avaliados por q-PCR 90 dias após a administração da última dose de DOX ou DOX+RSV ou DOX+CUR. Grupo controle (CTR), grupo doxorrubicina (DOX), grupo doxorrubicina associada ao resveratrol (DOX+RSV) e grupo doxorrubicina associada à curcumina (DOX+CUR). Os dados são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey).



6.2 Expressões gênicas das TET metilcitosinas dioxigenases

Com relação às enzimas TET metilcitosinas dioxigenases (TETs), nossos resultados demonstraram um aumento significativo da expressão gênica de *Tet1* nos animais pertencentes ao grupo DOX+RSV quando comparados aos demais grupos ($p < 0,0001$). Já *Tet2* apresentou um aumento de sua expressão nos animais dos grupos DOX e DOX+RSV quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). No entanto, os animais do grupo DOX+CUR demonstraram uma menor expressão de *Tet2* quando comparados aos animais dos grupos DOX e DOX+RSV ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Com relação à expressão de *Tet3* observou-se um aumento significativo nos animais dos grupos DOX ($p < 0,05$), DOX+RSV ($p < 0,001$) e DOX+CUR ($p < 0,0001$) quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 7).

Figura 7 - Efeito da DOX, associada ou não ao RSV ou à CUR sobre a expressão gênica das enzimas Tet metilcitosinas dioxigenases (*Tet1*, *Tet2* e *Tet3*). Os níveis de mRNA foram avaliados por q-PCR 90 dias após a administração da última dose de DOX ou DOX+RSV ou DOX+CUR. Grupo controle (CTR), grupo doxorrubicina (DOX), grupo doxorrubicina associada ao resveratrol (DOX+RSV) e grupo doxorrubicina associada à curcumina (DOX+CUR). Os dados são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey).



7 DISCUSSÃO

Em estudo realizado por Moretti *et al.* (2021), foi investigado se o RSV ou a CUR poderiam afetar a memória e a resposta glial no encéfalo de ratos Wistar machos adultos tratados com DOX. Após análises comportamentais (teste de campo aberto e reconhecimento de novos objetos) e análise imuno-histoquímica para a expressão astrocitária de GFAP e microglial de Iba1, foram observados déficits de memória de curto e longo prazo, bem como astrogliose e microgliose no córtex frontal, no hipotálamo e no hipocampo de ratos tratados com DOX. Os déficits de memória foram prevenidos por CUR no curto e no longo prazo, e por RSV, apenas no longo prazo. Além disso, ambos compostos, RSV e CUR, preveniram a astrogliose e a microgliose nas regiões estudadas.

No trabalho subsequente ao estudo acima, investigou-se a ocorrência de disfunção cognitiva em ratos Wistar machos adultos tratados com DOX durante a infância, em associação ou não com o RSV ou com a CUR. Os estudos comportamentais incluíram o teste de campo aberto, o teste de reconhecimento de novos objetos e o labirinto de Barnes. Adicionalmente, o estudo imuno-histoquímico analisou a expressão de GFAP, de Iba1 e de caspase-3 no córtex frontal, no hipotálamo e no hipocampo. Os resultados demonstraram astrogliose, microgliose e aumento da apoptose em todas as áreas estudadas na vida adulta dos animais injetados com DOX e tanto o RSV, quanto a CUR, foram capazes de prevenir tais achados. Além disso, a administração da DOX durante a infância foi capaz de prejudicar a memória espacial e a memória de curto e de longo prazo na vida adulta desses animais. Tais alterações foram prevenidas pela CUR, mas não pelo RSV (CARDOSO *et al.*, 2021).

Posto isso, no presente estudo, avaliamos a expressão gênica de várias enzimas envolvidas nos processos de metilação dinâmica do DNA nas células hipocâmpais, a fim de relacionarmos os benefícios na memória e na neuroinflamação observados pela administração de RSV ou CUR nos estudos previamente citados com possíveis alterações na expressão gênica das enzimas DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2 E TET3.

O aumento da expressão gênica de *Dnmt1* foi observado apenas no grupo DOX+CUR, grupo que, nos testes comportamentais, apresentou melhora na memória quando comparado ao grupo DOX (CARDOSO *et al.*, 2021). De modo geral, a inibição

da expressão desta enzima sugere prejuízos de memória e cognição (LIU *et al.*, 2011; TUNC-OZCAN *et al.*, 2018) e, embora sua regulação positiva no hipocampo não possua efeitos muito conhecidos, sabe-se que o aumento da metilação em genes como da fosfatase proteica 1 (*PP1*) na região CA1 favorece a consolidação da memória, pois aumenta a potenciação de longa duração (MILLER; SWEATT, 2007).

Observou-se ainda o aumento da expressão gênica das DNMTs *de novo*, *Dnmt3a* e *Dnmt3b*, no grupo DOX+RSV e, muito embora não tenha sido observada melhora na memória e cognição nos testes comportamentais com esses animais, os quadros de astrogliose e de microgliose foram eficientemente prevenidos nesse grupo, sugerindo a melhora no quadro de neuroinflamação pelo RSV. Neste contexto, uma possível relação com as referidas enzimas da maquinaria epigenética reside no fato de o RSV ser capaz de inibir a proteína ativadora de transcrição STAT3 (YU *et al.*, 2008). A ativação desta proteína é fortemente relacionada a danos neurais e à astrogliose (O'CALLAGHAN *et al.*, 2014; NEAL; RICHARDSON, 2018). Infere-se aqui, portanto, que, talvez, essa inibição se dê por meio da metilação do DNA, por conseguinte, pela regulação positiva da expressão gênica de *Dnmt3a* e *Dnmt3b*.

Além disso, a expressão gênica aumentada da enzima DNMT3b está relacionada com a diminuição da expressão do fator de transcrição NF- κ B, envolvido na resposta celular inflamatória (ATSUMI *et al.*, 2017). Logo, pode-se sugerir uma ação anti-inflamatória do RSV via recuperação da expressão gênica de *Dnmt3b*, após a queda na expressão observada no grupo DOX.

Por outro lado, a expressão gênica de *Dnmt3b* no grupo DOX+CUR foi diminuída, quando comparada ao grupo controle, o que nos pareceu contraditório, já que a deleção condicional de *Dnmt3b* na região CA1 do hipocampo prejudica a memória (KONG *et al.*, 2020). Em nossos estudos, porém, a CUR mostrou prevenir os danos à memória ocasionados pela DOX.

Com relação às metilcitosinas dioxigenases, temos a expressão gênica de *Tet1* aumentada apenas no grupo DOX+RSV. O aumento da expressão gênica desta enzima no hipocampo parece comprometer a consolidação da memória associativa de longo prazo e a neuroplasticidade (KAAS *et al.*, 2013; GREER, *et al.*, 2021). Por conseguinte, pode-se sugerir que a superexpressão dessa enzima esteja associada à ineficiência do RSV em prevenir os danos à memória ocasionados pelo tratamento

quimioterápico com DOX nos testes comportamentais realizados pelo grupo (CARDOSO *et al.*, 2021).

A TET2 é uma enzima associada à resposta microglial durante a neuroinflamação (CARRILLO-JIMENEZ *et al.*, 2019), o que sugere uma explicação para o aumento de sua expressão gênica no grupo DOX quando comparado ao grupo controle. Observa-se também que apenas a CUR foi capaz de reverter esse aumento na expressão de *Tet2*, corroborando com os estudos que demonstram sua capacidade de diminuir a neuroinflamação e os déficits de memória (DOLATABADI *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2021).

Por fim, TET3, embora abundantemente expressa no encéfalo de ratos, não tem seu papel muito conhecido no que se refere à memória e à cognição. Já foi sugerido que a superexpressão de *Tet3* prejudicaria esses processos, posto que diminui a transmissão sináptica glutamatérgica excitatória no hipocampo (LIU *et al.*, 2018) e a neurotransmissão glutamatérgica exerce um papel crucial subjacente à plasticidade sináptica, base fisiológica dos processos comportamentais de cognição e memória (RUGGIERO *et al.*, 2011).

Por outro lado, estudo comportamental sobre preferência de lugar induzida por cocaína demonstrou que *Tet3* tem expressão aumentada em neurônios piramidais do hipocampo dorsal após a recuperação da memória. O mesmo trabalho demonstrou que a diminuição da expressão de *Tet3* nesses neurônios hipocampais prejudicou a reconsolidação da memória associada à recompensa (LIU *et al.*, 2018), sugerindo um papel importante desta enzima na reconsolidação da memória.

Em nossos resultados, a expressão gênica de *Tet3* foi aumentada no grupo DOX e tanto o RSV quanto a CUR não foram capazes de prevenir tal aumento. Esses dados não nos permitem inferir se o aumento da expressão dessa enzima foi benéfico ou não para a memória em nosso estudo, já que os grupos DOX e DOX+RSV permaneceram com prejuízos, porém os animais do grupo DOX+CUR apresentaram melhora na memória.

Tomados em conjunto, nossos resultados destacam o papel da CUR como possível agente terapêutico no tratamento de disfunção cognitiva induzida por DOX, principalmente devido à sua capacidade de regular positivamente a *Dnmt1*, possivelmente aumentando a potenciação de longa duração no hipocampo (MILLER; SWEATT, 2007), e de diminuir a expressão de *Tet2*, corroborando com a diminuição

da resposta microglial (CARRILLO-JIMENEZ *et al.*, 2019). Ademais, a superexpressão de *Tet1* no grupo DOX+RSV pode nos ajudar a compreender o porquê os mesmos efeitos sobre a memória não foram observados no tratamento com o RSV (KAAS *et al.*, 2013; GREER *et al.*, 2021).

Como limitação do estudo destacamos a ausência dos grupos puros de CUR e RSV, que nos possibilitariam ver a ação desses fitoterápicos sobre as enzimas estudadas, sem a interação com a DOX.

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados destacam a possível eficiência da CUR como anti-inflamatório, neuroprotetor e regulador epigenético importante na prevenção de danos à memória e da neuroinflamação via, respectivamente, regulação positiva da expressão gênica de *Dnmt1* e regulação negativa de *Tet2*. O RSV, por sua vez, destaca-se como provável regulador epigenético da resposta neuroinflamatória, possivelmente inibindo a astrogliose no hipocampo por meio da regulação positiva da expressão gênica da *Dnmt3b* e consequente silenciamento de genes promotores de inflamação.

REFERÊNCIAS

- AHLES, T.A.; SAYKIN, A.J. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p. 192-201, 2007.
- ALIBEIKI, F.; JAFARI, N.; KARIMI, M.; PEERI DOGAHEH, H. Potent anti-cancer effects of less polar curcumin analogues on gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma cells. **Scientific Reports**, v. 7, p. 2559, 2017.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPEZ, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- ATSUMI, T.; SUZUKI, H.; JIANG, J.; OKUYAMA, Y.; NAKAGAWA, I.; OTA, M.; TANAKA, Y.; OHKI, T.; KATSUNUMA, K.; NAKAJIMA, K.; HASEGAWA, Y.; OHARA, O.; OGURA, H.; ARIMA, Y.; KAMIMURA, D.; MURAKAMI, M. Rbm10 regulates inflammation development via alternative splicing of Dnmt3b. **International Immunology**, v. 29, p. 581-591, 2017.
- BECK, D.B.; PETRACOVICI, A.; HE, C.; MOORE, H.W.; LOUIE, R.J.; ANSAR, M.; DOUZGOU, S.; SITHAMBARAM, S.; COTTRELL, T.; SANTOS-CORTEZ, R.L.P.; PRIJOLE, E.J.; BEND, R.; KEREN, B.; MIGNOT, C.; NOUGUES, M.; ÖUNAP, K.; REIMAND, T.; PAJUSALU, S.; ZAHID, M.; SAQIB, M.A.N.; BURATTI, J.; SEABY, E.G.; McWALTER, K.; TELEGRAFI, A.; BALDRIDGE, D.; SHINAWI, M.; LEAL, S. M.; SCHAEFER, G.B.; STEVENSON, R.E.; BANKA, S.; BONASIO, R.; FAHRNER, J.A. Delineation of human mendelian disorder of the DNA demethylation machinery: TET3 deficiency. **American Journal of Human Genetics**, v. 106, n. 2, p. 234-245, 2020.
- BROWN, V.A.; PATEL, K. R.; VISKADURAKI, M.; CROWELL, J.A.; PERLOFF, M.; BOOTH, T.D.; VASILININ, G.; SEN, A.; SCHINAS, A.M.; PICCIRILLI, G.; BROWN, K.; STEWARD, W.P.; GESCHER, A.J.; BRENNER, D.E. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics and effect on the insulin-like growth factor axis. **Cancer Research**, v. 70, p. 9003-9011, 2010.
- CAPPETTA, D.; DE ANGELIS A.; SAPIO L.; PREZIOSO, L.; ILLIANO, M.; QUAINI, F.; ROSSI, F.; BERRINO, L.; NAVIGLIO, S.; URBANEK, K. Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: A common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017, 2017.
- CARLSON, K.R.; ROTHGANGER, F; AIMONE, J.B. Computacional perspectives on adult neurogenesis. *In*: van Ooyen, A; Butz-Otdendorf, M, editors. **The Rewiring Brain**. Londres: Academic Press, p. 425-441, 2017.
- CARDOSO, C.V.; BONDAN, E.F. Doxorubicina e *chemobrain* - Estudos experimentais para a avaliação dos déficits cognitivos pós-quimioterapia. **Atas de Saúde Ambiental**, v. 6, p. 208-225, 2018.
- CARDOSO, C.V.; KIEL, S.G.; RODRIGUES, P.S.; SAMPAIO, A.C.; DIAS, E.N.; MEDEIROS, L.; MORETTI, R.L.; MARTINS, M.F.; BERNARDI, M.M.; SILVA, R.A.; BONDAN, E. F. Morphological, behavioural and epigenetic effects in adulthood

following doxorubicin administration in infant rats, associated or not with curcumin or resveratrol. **European Neuropsychopharmacology**, v. 53, supplement 1, p. 397-398, 2021.

CARRILLO-JIMENEZ, A.; DENIZ, O.; NIKLISON-CHIROU, M.V.; RUIZ, R.; BEZERRA-SALOMÃO, K.; STRATOULIAS, V.; AMOUROUX, R.; YIP, P.K.; VILALTA, A.; CHERAY, M.; SCOTT-EGERTON, A.M.; RIVAS, E.; TAYARA, K.; GARCÍA-DOMÍNGUEZ, I.; GARCIA-REVILLA, J.; FERNANDEZ-MARTIN, J.C.; ESPINOSA-OLIVA, A.M.; SHEN, X.; GEORGE-HYSLOP, P.S.; BROWN, G.C.; HAJKOVA, P.; JOSEPH, B.; VENERO, J.L.; BRANCO, M.R.; BURGUILLOS, M.A. TET2 regulates the neuroinflammatory response in microglia. **Cell Reports**. v. 29, p. 697-713, 2019.

DAVIS, J.; AHLBERG, F.M.; BERK, M.; ASHLEY, D.; KHASRAW. Emerging pharmacotherapy for cancer patients with cognitive dysfunction. **BMC Neurology**, v. 13, 2013.

DOLATABADI, L.K.; EMAMGHOREISHI, M.; NAMAVAR, M.R.; SARKALA, H.B. Curcumin effects on memory impairment and restoration of irregular neuronal distribution in the hippocampal CA1 region after global cerebral ischemia in male rats. **Basic and Clinical Neuroscience**, v. 10, n.5, p. 527-539, 2019.

GIBSON, E.M.; NAGARAJA, S.; OCAMPO, A.; TAM, L.T.; WOOD, L.S.; PALLERGAR, P.N.; GREENE, J.J.; GERAGHTY, A.C.; GOLDSTEIN, A.K.; NI, L.; WOO, P.J.; BARRES, B.A.; LIDDELOW, S.; VOGEL, H.; MONJE, M. Methotrexate chemotherapy induces persistent tri-gial dysregulation that underlies chemotherapy-related cognitive impairment. **Cell**, v. 176, p. 43-55, 2019.

GREER, C.B.; WRIGHT, J.; WEISS, J.D.; LAZARENKO, R.M.; MORAN, S.P.; ZHU, J.; CHRONISTER, K.S.; JIN, A.Y.; KENNEDY, A.J.; SWEATT, J.D.; KAAS, G.A. Tet1 Isoforms differentially regulate gene expression, synaptic transmission, and memory in the mammalian brain. **Journal of Neuroscience**, v. 41, n.4, p. 578-593, 2021.

HASSAN F.; REHMAN, M.S.; KHAN, M.S.; ALI, M.A.A.; JAVED, A.; NAWAZ, A.; YANG, C. Curcumin as an alternative epigenetic modulator: mechanism of action and potential effects. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 514, 2019.

HERNÁNDEZ, J.D.O.; AGUILAR, E.J.; GARCÍA, F.G. El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. **Revista Médica de la Universidad Veracruzana**. v. 15, p. 20-28, 2015.

HUEHNCHEN, P.; VAN KAMPEN, A.; BOEHMERLE, W.; ENDRES, M. Cognitive impairment after cytotoxic chemotherapy. **Neurooncology Practice**, v. 7, p. 11-21, 2020.

HWANG, J.; AROMOLARAN, K.A.; ZUKIN, R.S. The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. **Nature**. v. 18, p. 347-361, 2017.

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – USP. *Imprinting* genômico e mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica. Disponível em: <<https://www.ib.usp.br/biologia/bio230/Aula10.2.pdf>>. Acesso em 14 fev. 2022.

KAAS, G.A. ZHONG, C.; EASON, D.E.; ROSS, D.L.; VACHHANI, R.V.; MING, G.; KING, J.; SONG, H.; SWEATT, J.D. TET1 controls CNS 5-methylcytosine

hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. **Neuron**, v. 79, p. 1086-1093, 2013.

KHAN, M.S.; MUHAMMAD, T.; IKRAM, M.; KIM, M.O. Dietary supplementation of the antioxidant curcumin halts systemic LPS-Induced neuroinflammation and memory/synaptic impairment via the JNK/NF- κ B/Akt signaling pathway in adult rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-23, 2019.

KONG, Q.; YU, M., ZANG, M.; WEI, C.; GU, H.; YU, S. SUN, W.; LI, N.; ZHOU, Y. Conditional Dnmt3b deletion in hippocampal dCA1 impairs recognition memory. **Molecular Brain**, v. 13, p. 574-579, 2020.

LISMAN, J.; BUZSÁKI, G.; EICHENBAUM, H.; NADEL, L.; RANGANATH, C.; REDISH, A.D. Viewpoints: ow the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. **Nature Neuroscience**, v. 20, p. 1434-1447, 2017.

LIU, C.; SUN, X.; WANG, Z.; LE, Q.; LIU, P.; JIANG, C.; WANG, F.; MA, L. Retrieval-induced upregulation of Tet3 in pyramidal neurons of the dorsal hippocampus mediates cocaine-associated memory reconsolidation. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 255-266, 2018.

LIU, L.; VAN GROEN, T.; KADISH I.; LI, Y.; WANG, D.; JAMES, S.R.; KARPF, A.R.; TOLLEFSBOL, T.O. Insufficient DNA methylation affects healthy aging and promotes age-related health problems. **Clinical Epigenetics**, v. 2, n. 2, p. 349-360, 2011.

LIU, R.Y.; ZHANG, Y.; COUGHLIN, B.L.; CLEARY, L.J.; BYRNE, J.H. Doxorubicin attenuates serotonin-induced long-term synaptic facilitation by phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, p. 13289-13300, 2014.

MANCHON, J.F.; DABAGHIAN, Y.; UZOR, N.E.; KESLER, S.R.; WEFEL, J.S.; TSVETKOV, A.D. Levetiracetam mitigates doxorubicin-induced DNA and synaptic damage in neurons. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25705, 2016.

MAUGERI, A.; BARCHITTA, M.; MAZZONE, M.G.; GIULIANO, F.; BASILE, G.; AGODI, A. Resveratrol modulates SIRT1 and DNMT functions and restores LINE-1 methylation levels in ARPE-19 cells under oxidative stress and inflammation. **International Journal of Molecular Science**, v. 19, 2018.

MCGOWAN, J.C.; CHUNG, R.; MAULIK, A.; PIOTROWSKA, I.; WALKER, J.M.; YELLON, D.M. Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 31, p. 63-75, 2017.

MILLER, C.A.; SWEATT, J.D. Covalent modification of DNA regulates memory formation. **Neuron**, v. 53, p. 857-869, 2007.

MORETTI, R.L.; DIAS, E.N.; KIEL, S.G.; AUGUSTO, M.C.M; RODRIGUES, P.S.; SAMPAIO, A.C.S.; MEDEIROS, L.S.; MARTINS, M.F.M.; SUFFREDINI, I.B.; CARDOSO, C.V.; BONDAN, E.F. Behavioral and morphological effects of resveratrol and curcumin in rats submitted to doxorubicin-induced cognitive impairment. **Research in Veterinary Science**, v. 140, p. 242-250, 2021.

MORRIS, M.J.; ADACHI, M.; NA, E.S.; MONTEGGIA, L.M. Selective role for Dnmt3a in learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 115, p. 30-37, 2014.

MULLER, H.R.; PRADO, K.B. Epigenética: um novo campo da genética. **Rubs**, v.1, n.3, p.61-69, 2008.

NEAL, M.; RICHARDSON, J.R. Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. **Molecular Basis of Disease**, v. 1864, p. 432-443, 2018.

NELSON, K.M.; DAHLIN, J.L.; BISSON, J.; GRAHAM, J.; PAULI, G.F.; WALTERS, M.A. The essential medicinal chemistry of curcumin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1620-1637, 2017.

NESTOR, C.E.; OTTAVIANO, R.; REDDINGTON, J.; SPROUL, D.; REINHARDT, D.; DUNICAN, D.; KATZ, E.; DIXON, J.M.; HARRISON, D.J.; MEEHAN, R.R. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. **Genome Research**, v. 22, p. 467-477, 2012.

O'CALLAGHAN, J.P.; KELLY, K.A.; VANGILDER, R.L.; SOFRONIEW, M.V.; MILLER, D.B. Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. **Plos One Journal**, v.9, n.7, p. e102003, 2014.

OKANO, M.; BELL, D.W.; HABER, D.A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, p. 247-257, 1999.

O'KEEFE, J.; NEDEL, L. **The Hippocampus as a Cognitive Map**. Londres: Oxford University Press, 1978.

PALIWAL, A.; NIGAM, A.K.; GOUR, J.K.; SINGH, D.; PANDEY, P.; SINGH, M.K. Curcumin. In: BELWAL, T.; NAVABI, S.M.; NAVABI, S.F.; DEHPOUR, A.R.; SHIROOIE, S., editores. **Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease**. São Paulo: Academic Press, 2021. p. 49-63.

PATEL, K.R.; SCOTT, E.; BROWN, V.A.; GESCHER, A.J.; STEWARD, W.P., BROWN, K. Clinical trials of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 161-169, 2011.

PIERREFICHE, O. Synaptic plasticity in the hippocampus and alcohol exposure during brain development. In: PREEDY, V.R., editor. **Neuroscience of Alcohol: Mechanisms and Treatment**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. p. 99-108.

PUBCHEM. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 31703, Doxorubicin. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin>>. Acesso em 07 mai. 2021.

QIAO, X.; ZANDEN, S.Y.; WANDER, D.P.A.; BORRAS, D.M.; SONG, J.; LI, X.; DUIKEREN, S.; GILS, N.; RUTTEN, A.; HERWAARDEN, T.; TELLINGEN, O.; GIACOMELLI, E.; BELLIN, M.; ORLOVA, V.; TERTOOLEN, L.G.J.; GERHARDT, S.;

AKKERMANS, J.J.; BAKKER, J.M.; ZUUR, C.L.; PANG, B.; SMITS, A.M.; MUMMERY, C.L.; SMIT, L.; ARENS, R.; LI, J.; OVERKLEEF, H.S.; NEEFJES, J. Uncoupling DNA damage from chromatin damage to detoxify doxorubicin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 26. p. 15182-15192, 2020.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.21, p. 933-956, 1996.

RUGGIERO, R.N.; BUENO-JÚNIOR, L.S.; FACHIM, H.A.; PADOVAN-NETO, F.E.; MERLO, S.; ROHNER, C.J.S.; IKEDA, E.T.; BRUSCO, J.; MOREIRA, J.E. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 44, n.2, p. 143-56, 2011.

SHEHZAD, A; SHEHZAD, R; LEE, S.Y. Curcumin: a potent modulador of multiple enzymes in multiple cancers. In: BATHAIE, Z; TAMANOI, F, editors. **The Enzymes**. v. 36. Londres: Academic Press, 2014. p. 149-174.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.16, p. 449-466, 2005.

TUNC-OZCAN, E.; WERT, S.L.; LIM, P.H.; FERREIRA, A.; REDEI, E.E. Hippocampus-dependent memory and allele-specific gene expression in adult offspring of alcohol-consuming dams after neonatal treatment with thyroxin or metformin. **Molecular Psychiatry**, v. 23, p. 1643-1651, 2018.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M.; ROZEN, S.G. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. e115, 2012.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Highlights of prescribing information for doxorubicin hydrochloride**. New York, 2013. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/050467s073lbl.pdf>. Acesso em 20 abr. 2021.

WANG, S.; LIN, P.; CHIU, Y.; HUANG, J.; KUO, Y.; WU, J.; CHEN, C. Curcumin-mediated HDAC inhibition suppresses the DNA damage response and contributes to increased DNA damage sensitivity. **Plos One**, v. 10, 2015.

WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 9-15, 2011.

WEFEL, J.S., SALEEBA, A.K., BUZDAR, A.U., MEYERS, CA. Acute and late onset cognitive dysfunction associated with chemotherapy in women with breast cancer. **Cancer**, v. 116, p. 3348-3356, 2010.

XIE, J.; ZHANG, X.; ZHANG, L. Negative regulation of inflammation by SIRT1. **Pharmacological Research**, v. 67, p. 60-67, 2013.

YU, H.; SU, Y.; SHIN, J.; ZHONG, C.; GUO, J.U.; WENG, Y.; GAO, F.; GESCHWIND, D.H.; COPPOLA, G.; MING, G.; SONG, H. Tet3 regulates synaptic transmission and

homeostatic plasticity via DNA oxidation and repair. **Nature Neuroscience**, v. 18, p. 836-846, 2015.

YU, L.J.; WU, M.L.; CHEN, X.Y., WANG, Q., SUN, Y., KONG, Q.Y.; LIU, J. Inhibition of STAT3 expression and signaling in resveratrol-differentiated medulloblastoma cells. **Neoplasia**, v. 10, n. 7, p. 736-744, 2008.