

UNIVERSIDADE PAULISTA

EURIDES NASCIMENTO DIAS

**ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MORFOLÓGICOS DA
ADMINISTRAÇÃO DE DONEPEZIL EM RATOS WISTAR COM DISFUNÇÃO
COGNITIVA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA**

SÃO PAULO

2025

EURIDES NASCIMENTO DIAS

**ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MORFOLÓGICOS DA
ADMINISTRAÇÃO DE DONEPEZIL EM RATOS WISTAR COM DISFUNÇÃO
COGNITIVA INDUZIDA 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.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan

SÃO PAULO

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Dias, Eurides Nascimento.

Estudo dos efeitos comportamentais e morfológicos da administração de donepezil em ratos Wistar com disfunção cognitiva induzida por doxorubicina / Eurides Nascimento Dias. - 2025.
35 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2025.

Área de concentração: Modelos Experimentais em Patologia e Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

1. Acetilcolinesterase 2. Efeitos cognitivos 3. Glia 4. Neurotoxicidade 5. Testes comportamentais 6. Efeitos cognitivos.

I. Bondan, Eduardo Fernandes (orientador). II. Título.

EURIDES NASCIMENTO DIAS

**ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MORFOLÓGICOS DA
ADMINISTRAÇÃO DE DONEPEZIL EM RATOS WISTAR COM DISFUNÇÃO
COGNITIVA INDUZIDA 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.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____ / _ / _____

Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan
Universidade Paulista

_____ / _ / _____

Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten
Universidade Paulista

_____ / _ / _____

Prof.^a Dr.^a Maria Letícia Baptista Salvadori
Centro universitário São Camilo

RESUMO

A antraciclina doxorubicina (DOX) é amplamente utilizada em quimioterapia devido à sua eficácia no combate a uma ampla gama de cânceres, como carcinomas, sarcomas e cânceres hematológicos. Devido à ocorrência de comprometimentos cognitivos (também conhecidos como *chemobrain* ou *chemofog*) em indivíduos submetidos à quimioterapia de longo prazo com DOX, estratégias terapêuticas para prevenir ou minimizar tais déficits são pesquisadas. Como a DOX apresenta baixa penetração no cérebro, propõe-se que o tratamento com DOX possa desencadear uma resposta pró-inflamatória sistêmica com elevação de citocinas pró-inflamatórias que podem atravessar a barreira hematoencefálica e podem estar envolvidas no aumento de moléculas oxidativas e citocinas pró-inflamatórias que, em conjunto, induzem astrogliose em todo o cérebro, provavelmente causando déficits cognitivos/de memória induzidos pela quimioterapia. Donepezil (DON) é um inibidor reversível, não competitivo, da colinesterase do tipo piperidina, usado para tratar demência do tipo Alzheimer. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento com DON sobre os comprometimentos de memória e ativação glial induzidos por DOX. Ratos Wistar machos adultos foram divididos em 4 grupos (8 animais por grupo) - ratos injetados com DOX (2,5 mg/kg/semana por 3 semanas, via intraperitoneal - IP); ratos recebendo DOX e DON (2,5 mg/kg/semana de DOX por 3 semanas, IP, mais 5 mg/kg/dia de DON por 21 dias, gavagem); ratos recebendo DON (5 mg/kg/dia por 21 dias, gavagem); ratos injetados com solução salina a 0,9% (IP). No 21º dia, o teste de campo aberto e a tarefa de reconhecimento de novos objetos (NORT) foram realizados 3 e 24 horas após a habituação. Os ratos foram então eutanasiados, os encéfalos foram removidos e analisados por imuno-histoquímica (GFAP, para astrócitos, e Iba1 para micróglia) e pelas técnicas de coloração com hematoxilina-eosina e luxol fast blue. A análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey foi usada para analisar os resultados do campo aberto e os dados morfométricos. A ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni foi usada para analisar o tempo de interação no NORT. O teste de campo aberto revelou que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos relacionadas às frequências de locomoção e elevação no final do experimento. A administração de DOX induziu comprometimentos de memória, como visto no NORT 3 e 24 horas após

a habituação. Tais déficits foram prevenidos pelo DON em ambos os períodos. A DOX também causou um aumento na expressão de GFAP e Iba1 no hipocampo (área CA1), o que foi evitado pela administração de DON. Não foram encontrados sinais de desmielinização ou perda neuronal em qualquer grupo. DON preveniu perdas de memória de curto e longo prazo, bem como a astrogliose e a microgliose induzidas pela DOX isoladamente.

Palavras-chave: acetilcolinesterase; *chemobrain*; efeitos cognitivos; glia; neurotoxicidade; testes comportamentais

ABSTRACT

The anthracycline doxorubicin (DOX) is widely used in chemotherapy due to its efficacy in fighting a wide range of cancers such as carcinomas, sarcomas and hematological cancers. Due to the occurrence of cognitive impairments (also known as chemobrain or chemofog) in individuals undergoing long-term chemotherapy with DOX, therapeutic strategies to prevent or minimize such deficits are searched. As DOX presents a poor penetration into the brain, it is proposed that the DOX treatment can elicit a systemic proinflammatory response with elevation of proinflammatory cytokines that can cross the blood-brain barrier and can be involved in the increase of oxidative molecules and proinflammatory cytokines that, in conjunct induce astrogliosis all over the brain, probably causing chemotherapy-induced cognitive / memory deficits. Donepezil (DON) is a reversible, noncompetitive, piperidine-type cholinesterase inhibitor acetylcholinesterase inhibitor used to treat dementia of the Alzheimer's type. This study aimed to investigate the effects of DON treatment on the memory impairments and glial activation induced by DOX. Adult male Wistar rats were divided into 4 groups (8 animals per group) - rats injected with DOX (2.5 mg/kg/week for 3 weeks, intraperitoneal route - IP); rats receiving DOX and DON (2.5 mg/kg/week of DOX for 3 weeks, IP, plus 5 mg/kg/day of DON for 21 days, gavage); rats receiving DON (5 mg/kg/day for 21 days, gavage); rats injected with 0.9% saline solution (IP). On the 21th day, the open field test and the novel object recognition task (NORT) at 3 and 24 hours after habituation were performed. Rats were then euthanized, brains were removed and analyzed by immunohistochemistry (GFAP, for astrocytes, and Iba1 for microglia) and by hematoxylin-eosin and luxol fast blue staining techniques. One-way analysis of variance followed by Tukey's test was used to analyze open field results and morphometric data. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test was used to analyze interaction time in NORT. The open field test revealed that no statistical differences were noted between groups related to locomotion and rearing frequencies at the end of the experiment. DOX administration induced memory impairments as seen in the NORT at 3 and 24 hours after habituation. Such deficits were prevented by DON at both periods. DOX also caused an increased GFAP and Iba1 expression in the hippocampus (CA1 area) and this was avoided by DON administration. No signs of demyelination or neuronal loss were found in any group.

DON prevented short-term and long-term memory losses, as well as astrogliosis and microgliosis induced by DOX alone.

Keywords: acetylcholinesterase; behavioral tests; chemobrain; cognitive effects; glia; neurotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Teste de campo aberto no dia 21 do estudo: grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). Os dados são expressos como média \pm EPM. $p > 0,05$ (ANOVA de uma via).....21
- Figura 2** –Tempo de interação em segundos (s) com um objeto novo ou previamente explorado 3h e 24h após o período de habituação no teste de reconhecimento de objeto novo (NORT): grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). Os dados são expressos como média \pm EPM para o tempo de interação. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni).....22
- Figura 3** – Fotomicrografias representativas da marcação de imuno-histoquímica de Iba1 no hipocampo (área CA1) de ratos, tratados conforme os seguintes grupos experimentais: grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). As imagens foram obtidas com objetiva de 40x.....24
- Figura 4** – Expressão micrógliar Iba1 no hipocampo (área CA1) de ratos, tratados conforme os seguintes grupos experimentais: grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). Os dados são expressos como média \pm EPM. **** $p < 0,0001$ (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). O índice de micrógliia por área representa a proporção da área marcada em relação à área total da imagem, sendo 0 a completa ausência de marcação e 1 a marcação total da área.....24
- Figura 5** – Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para GFAP no hipocampo (área CA1) de ratos, tratados conforme os seguintes grupos experimentais: grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). As imagens foram obtidas com objetiva de 40x.....25
- Figura 6** – Expressão astrocitária da GFAP do hipocampo (área CA1) de ratos, conforme os seguintes grupos experimentais: Grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via

i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorrubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). Os dados são expressos como média \pm EPM. ****p < 0,0001 (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). O índice de astrócitos por área representa a proporção da área corada em relação à área total da imagem, sendo 0 a ausência completa de coloração e 1 a coloração total da área.....25

LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha 7$ nAChR — *alpha7 nicotinic acetylcholine receptor*

ACh — acetilcolina

AChE — inibidor da enzima acetilcolinesterase

ANOVA — análise de variância

ApoA1 — apolipoproteína A1

BHE — barreira hematoencefálica

DA — doença de Alzheimer

DON — donepezil

DOX — doxorubicina

ECG — eletrocardiograma

EPM — erro padrão da média

FDA — *Food and Drug Administration*

GFAP — *glial fibrillary acidic protein*

Iba-1 — *ionized calcium binding adaptor molecule 1*

IL-1 β — interleucina 1-beta

IL-6 — interleucina-6

IP — intraperitoneal

NF- κ B — fator de transcrição nuclear kappa B

Nrf2 — fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

ROS — espécies reativas de oxigênio

SPF — *specific pathogen free*

SNC — sistema Nervoso Central

SNP — sistema nervoso periférico

TNF- α — fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	9
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivos Específicos	14
3	HIPÓTESE	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Animais	16
4.2	Delineamento experimental	16
4.3	Avaliação comportamental	18
4.3.1	Teste de campo aberto	18
4.3.2	Teste de reconhecimento de novo objeto (NORT)	18
4.4	Avaliação morfológica	18
4.4.1	Coleta do material	18
4.4.2	Estudo morfológico do tecido nervoso	19
4.5	Análise estatística	19
5	RESULTADOS	20
5.1	Avaliação comportamental	20
5.2	Avaliação morfológica	23
6	DISCUSSÃO	26
7	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31
	ANEXOS	35
	Anexo 1 — Comprovante de aprovação do projeto junto ao CEUA - UNIP	35

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O avanço nas terapias oncológicas tem elevado significativamente as taxas de sobrevida entre pacientes com câncer, especialmente em casos de câncer de mama, cuja taxa de sobrevivência pode ultrapassar 90% nos primeiros cinco anos após o diagnóstico (RAPP *et al.*, 2024). Esse aumento tem ampliado o número de sobreviventes e intensificado o interesse pelos efeitos adversos tardios, como o comprometimento cognitivo induzido por quimioterapia, conhecido como *chemobrain* caracterizado por alterações como lapsos de memória, lentidão de raciocínio e dificuldades de concentração, este que quadro impacta significativamente a qualidade de vida (WHITTAKER *et al.*, 2022; KERKMANN *et al.*, 2024). A doxorrubicina (DOX) é um quimioterápico amplamente utilizado, pertencente à classe das antraciclinas, derivadas de microrganismos do gênero *Streptomyces*. Sua eficácia no tratamento de tumores sólidos está bem estabelecida, embora seja acompanhada por eventos adversos relevantes, como náuseas, estomatite, perda de apetite, diarreia, fadiga, tontura, queda de cabelo e, em especial, cardiotoxicidade cumulativa que limita sua administração prolongada (ŠIMŮNEK *et al.*, 2009). Uma das maiores preocupações se refere ao efeito cardiovascular, entretanto, há um crescente corpo de evidências sugerindo que a DOX também pode afetar negativamente o sistema nervoso central (SNC). Mesmo com baixa capacidade de atravessar diretamente a barreira hematoencefálica (BHE), a droga pode induzir a oxidação da apolipoproteína A1 (ApoA1) no plasma, o que leva à liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A ApoA1 é um polipeptídeo composto por α -hélices anfipáticas, sendo a principal proteína das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Ela desempenha um papel crucial na regulação do tráfego reverso de colesterol e na modulação das respostas inflamatórias e imunológicas (GORDON *et al.*, 2011). Esse mediador inflamatório pode acessar o SNC por meio de mecanismos mediados por 10 receptores, onde desencadeia uma resposta neuroinflamatória marcada pela ativação de células gliais e liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo para um ambiente neurotóxico e prejudicial às funções cognitivas (EL-AGAMY *et al.*, 2017; ONGNOK *et al.*, 2021a).

WU *et al.* (2016) observaram que, logo após a administração de DOX em roedores, houve um aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α ,

interleucina 1-beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), particularmente nas regiões do hipocampo e do córtex pré-frontal. É importante ressaltar que a liberação de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo foi proposta como possível alvo da disfunção cognitiva (CIBELLI *et al.*, 2010). Esse processo inflamatório é, em grande parte, mediado pela ativação de células gliais, especialmente astrócitos e micróglia, que desempenham papel central na resposta neuroimune. (KWON *et al.*, 2020). No entanto, o papel específico dessas células no comprometimento cognitivo associado à quimioterapia, especialmente em cenários de longo prazo, ainda não está completamente elucidado, representando uma importante lacuna a ser explorada por futuras investigações.

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor fundamental na regulação de processos cognitivos, como memória e aprendizagem, além de desempenhar um papel importante na modulação da resposta inflamatória por meio do chamado reflexo colinérgico anti-inflamatório (HUANG *et al.*, 2022). Donepezil (DON), um inibidor seletivo da enzima acetilcolinesterase (AChE), atua aumentando os níveis sinápticos de acetilcolina ao inibir sua degradação, o que contribui para a melhora da neurotransmissão colinérgica. Essa ação justifica seu amplo uso terapêutico em condições que envolvem comprometimento cognitivo, como a doença de Alzheimer (DA) (SHIN *et al.* 2018; HUANG *et al.*, 2022).

O DON é um fármaco de segunda geração pertencente à classe dos derivados da piperidina. Sua formulação farmacêutica baseia-se no cloridrato de donepezila, princípio ativo responsável por sua ação terapêutica. O DON é amplamente utilizado no tratamento da demência leve a moderada associada à DA, embora também possa ser indicado em outras formas de demência (SUTTHAPITAKSAKUL *et al.*, 2021). A aprovação inicial do fármaco ocorreu em 1996, pelo *Food and Drug Administration* (FDA), e desde então passou a ser comercializado mundialmente, especialmente sob o nome comercial Aricept® (WILKINSON, 1999; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022). O medicamento está disponível em diversas formulações, incluindo comprimidos orais revestidos e de desintegração oral, nas doses de 5 mg, 10 mg e 23 mg (UNITED STATES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018; SUTTHAPITAKSAKUL *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2023), bem como em formulações transdérmicas, nas dosagens de 5 mg e 10 mg (UNITED STATES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2022; KUMAR *et al.*, 2023).

O perfil farmacocinético do DON apresenta biodisponibilidade oral de aproximadamente 100%, sendo rapidamente e completamente absorvido,

independentemente da ingestão concomitante de alimentos. A concentração plasmática máxima é geralmente atingida entre 3 e 4 horas após a administração oral. O estado de equilíbrio farmacocinético é alcançado após cerca de 15 dias de uso contínuo, refletindo sua meia-vida plasmática prolongada e característica de acúmulo gradual no organismo. O fármaco se liga em grande parte a proteínas plasmáticas, especialmente à albumina, e atravessa facilmente a BHE. Sua metabolização ocorre principalmente no fígado, por meio das enzimas CYP2D6, CYP3A4 e pela glicuronidação, gerando metabólitos ativos. A meia-vida plasmática do DON é de cerca de 70 horas, e sendo majoritariamente excretado pelos rins (57%) e, em menor proporção, pelas fezes (5%). Os efeitos adversos mais frequentes envolvem o tubo gastrointestinal, com náuseas, diarreia e vômitos, geralmente leves e temporários. Outros efeitos incluem insônia, câibras musculares, fadiga e perda de peso, especialmente com doses mais altas. Além disso, o medicamento pode causar bradicardia, bloqueio cardíaco, síncope e alterações no eletrocardiograma (ECG). Em casos raros, efeitos mais graves como síndrome neuroléptica maligna, rabdomiólise e hepatotoxicidade podem ocorrer, resultando em elevação das enzimas hepáticas e icterícia (WILKINSON, 1999; DAVIS *et al.*, 2013; SUTTHAPITAKSAKUL *et al.*, 2021; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022; KUMAR *et al.*, 2023). O uso de DON deve ser utilizado com cautela em pacientes com distúrbios cardíacos, especialmente aqueles com bradicardia, bloqueios de condução cardíaca ou prolongamento do intervalo QT (HOWES, 2014; KUMAR *et al.*, 2023).

O mecanismo de ação do DON baseia-se em sua atuação como inibidor seletivo, reversível e não competitivo, da enzima AChE (WILKINSON, 1999). Ao inibir a AChE, o DON impede a degradação da ACh, aumentando sua disponibilidade na fenda sináptica e, conseqüentemente, promovendo uma melhora na neurotransmissão colinérgica, especialmente no SNC. Esse aumento na concentração de ACh potencializa a transmissão colinérgica, mecanismo considerado fundamental para a modulação de funções cognitivas como memória, aprendizado e atenção (SUTTHAPITAKSAKUL *et al.*, 2021; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022; KUMAR *et al.*, 2023). Embora a ACh esteja presente tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP), o DON se destaca por sua alta seletividade pela AChE do SNC. Essa característica reduz significativamente a probabilidade de efeitos colinérgicos indesejáveis em tecidos periféricos, como náuseas, diarreia, bradicardia e fasciculações musculares; eventos

adversos comumente associados à inibição periférica da AChE (WILKINSON, 1999). Em um modelo experimental, Kosasa e colaboradores (1999) investigaram a menor dose de DON capaz de aumentar os níveis de ACh no córtex cerebral de ratos, comparando-a à dose mínima necessária para provocar fasciculações musculares, indicativas de ação periférica. Os achados confirmaram a predominância da ação central do fármaco em concentrações terapêuticas, reforçando sua indicação em distúrbios neurodegenerativos nos quais é desejável potencializar a neurotransmissão colinérgica central, com mínimos efeitos colaterais sistêmicos.

O DON apresenta efeitos neuroprotetores que extrapolam sua conhecida função como inibidor da AChE, contribuindo para a preservação da integridade neuronal em distintos contextos fisiopatológicos. Diversos estudos com modelos animais e culturas celulares demonstram sua eficácia em condições de estresse oxidativo, inflamação e lesão neurotóxica, nas quais o aumento da disponibilidade de ACh por si só não seria suficiente para justificar os benefícios observados (LIU *et al.*, 2016; ONGNOK *et al.*, 2021b, HUANG *et al.*, 2022). Entre os mecanismos moleculares envolvidos, destacam-se a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a atenuação da ativação da via apoptótica mitocondrial e a indução da expressão de fatores tróficos neuronais (ONGNOK *et al.*, 2021b). Em modelos experimentais de depleção colinérgica, o pré-tratamento com o DON demonstrou eficácia na atenuação de déficits comportamentais, como prejuízos na memória de trabalho e na discriminação espacial, além de reduzir a expressão de marcadores de apoptose, como a atividade da caspase-3 em regiões encefálicas vulneráveis, como o hipocampo e o córtex cerebral (CUTULI *et al.*, 2013).

A compreensão dos receptores e das vias intracelulares envolvidas na ação do DON é essencial para elucidar seus efeitos terapêuticos e adversos, além de auxiliar no desenvolvimento de intervenções farmacológicas mais eficazes. Embora a inibição AChE permaneça como seu principal alvo, evidências recentes indicam que o fármaco também interage com receptores colinérgicos e vias de sinalização celular que expandem seu perfil farmacodinâmico. Nesse contexto, destaca-se a ativação indireta de receptores muscarínicos (BASSELIN *et al.*, 2009) e nicotínicos, especialmente do subtipo $\alpha 7$, formado exclusivamente por subunidades α . A estimulação desses receptores tem sido associada à modulação da plasticidade sináptica e à liberação de fatores neurotróficos, ambos fundamentais para os processos de aprendizagem e memória (TAKADA-TAKATORI *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2010).

Adicionalmente, a ativação dos $\alpha 7$ *nicotinic acetylcholine receptors* ($\alpha 7$ nAChRs) tem sido relacionada à supressão de processos inflamatórios no SNC, com redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias e mitigação da neurotoxicidade. Esses efeitos são observados tanto em modelos da DA quanto em contextos de neuroinflamação induzida por quimioterápicos, sugerindo o potencial uso adjuvante do DON em condições além das demências tradicionais (LIU *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2023).

Crescentes evidências indicam que astrócitos e micróglias participam ativamente do processo inflamatório e da disfunção cognitiva induzida por quimioterapia (KWON *et al.*, 2020), embora os mecanismos exatos ainda não estejam totalmente esclarecidos. Nesse contexto, destaca-se o papel da ACh, neurotransmissor essencial na cognição e na modulação da resposta inflamatória. O DON, AChE, promove o aumento da ACh nas sinapses e apresenta efeitos adicionais sobre receptores nicotínicos, contribuindo para a plasticidade sináptica e função neuronal (SHIN *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2022). Embora amplamente utilizado em distúrbios neurodegenerativos, ainda são escassos os estudos que avaliam o efeito do DON frente à neurotoxicidade induzida por quimioterápicos. A partir dessas evidências, o presente estudo se propôs a investigar os efeitos do DON sobre as alterações comportamentais e gliais induzidas pela DOX, como possível estratégia de prevenção ou mitigação do *chemobrain*.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi de investigar os efeitos comportamentais e morfológicos da administração do DON no tratamento da disfunção cognitiva resultante da quimioterapia com DOX.

2.1 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos comportamentais, investigando os possíveis benefícios da utilização de DON em relação aos danos cognitivos decorrentes do tratamento quimioterápico com DOX, mediante realização dos testes de campo aberto e de reconhecimento de novos objetos.

- Investigar os efeitos morfológicos no hipocampo dos diferentes grupos, mediante análise de cortes corados com hematoxilina-eosina e com marcação imunohistoquímica para avaliação da resposta microglial (Iba1) e astrocitária (GFAP) após administração de DOX e tratamento com DON.

3 HIPÓTESE

O DON, fármaco utilizado no tratamento da DA, exerce efeitos neuroprotetores em modelo animal de disfunção cognitiva induzida por quimioterapia (*chemobrain*), modulando a reatividade de células gliais, como micróglia e astrócitos, o que sugere uma ação reguladora sobre a via neuroinflamatória.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo, foram utilizados 32 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, adultos de três meses de idade, com peso entre 300 e 320 gramas. Os ratos foram mantidos em condições *specific pathogen free* (SPF), em uma sala com controle de temperatura e umidade, e sob um ciclo claro/escuro padrão de 12 horas, com acesso livre à comida e água. Todos os procedimentos seguiram as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Paulista, Brasil (autorização n.º 5070220324). Foi empenhado todo esforço para atenuar o sofrimento, diminuir a quantidade de animais empregados e recorrer a alternativas às técnicas *in vivo* sempre que possível. Os experimentos seguiram rigorosamente os protocolos de boas práticas de laboratório e métodos de garantia de qualidade.

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos:

1. Grupo controle (n=8): Ratos injetados com solução salina 0,9% por via intraperitoneal (IP) e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas;
2. Grupo DOX (n=8): Ratos injetados com DOX (Fauldoxo® 2,5 mg/kg/semana) por via IP e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas;
3. Grupo DON (n=8): Ratos injetados com solução salina 0,9% por via IP e tratados com DON (5 mg/kg/dia) por gavagem diária durante 3 semanas;
4. Grupo DOX + DON (n=8): Ratos injetados com DOX (2,5 mg/kg/semana) por via IP e DON (5 mg/kg/dia), por gavagem diária durante 3 semanas.

4.3 Avaliação Comportamental

Como procedimentos para o estudo comportamental dos animais foram utilizados os testes de campo aberto e de reconhecimento de novo objeto (CARDOSO, *et al.*, 2020). O teste do campo aberto foi realizado ao final do experimento para avaliação da atividade motora e exploratória dos animais (AMARO-LEAL, *et al.*, 2024). Este procedimento tem como objetivo garantir que os resultados apresentados nos demais testes comportamentais não sejam resultado de qualquer tipo de comprometimento motor ou exploratório que os animais possam apresentar como decorrência do tratamento com DOX. O teste de reconhecimento de novo objeto foi realizado apenas uma única vez durante a última semana de experimento, para assegurar que não ocorra qualquer tipo de preferência, aversão ou aquisição de memória, que, eventualmente, possa comprometer o resultado final dos testes (MATHIASSEN; DICAMILLO, 2010; LUEPTOW, 2017). Todas as avaliações comportamentais foram realizadas por dois observadores, sendo os resultados considerados como a média dos valores obtidos por ambos.

4.3.1 Teste de campo aberto

O campo aberto é constituído de uma arena com 97 cm de diâmetro, paredes de 33 cm de altura, pintado de branco e com fundo dividido em 19 partes aproximadamente iguais. O aparelho foi localizado em uma sala de 1,8 x 4,6 m e iluminado por uma lâmpada de 15 lux como iluminação de fundo.

Este equipamento foi lavado com uma solução de álcool-água a 5% antes da colocação dos animais para abreviar possíveis vieses causados por odores. Nesse teste, os animais foram colocados no campo aberto sempre durante o mesmo período (manhã). Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e observado por 5 minutos. O teste de campo aberto foi executado ao final do experimento, para a avaliação da atividade locomotora e exploratória dos ratos (PRUT; BELZUNG, 2003; CALDARONE; ZACHARIOU; KING, 2015). E foi registrado por câmera de vídeo para posterior análise. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) locomoção total: número total de linhas cruzadas com as quatro patas;
- b) locomoção periférica: número total de linhas cruzadas com as quatro patas no círculo periférico do campo aberto;

c) levantar (*rearing*): número de vezes em que os roedores permanecem sobre as patas traseiras.

4.3.2 Teste de reconhecimento de novo objeto (NORT)

Para avaliação do reconhecimento de novos objetos os animais, após serem submetidos ao teste de campo aberto, foram novamente colocados 24 horas após nesta arena por um período de 5 minutos, com a presença de três objetos de mesma cor, tamanho e forma, e com peso relativamente alto para evitar que pudessem ser movimentados pelo rato. A interação com tais objetos neste primeiro teste foi empregada para assegurar que não existam preferências intrínsecas, tampouco aversões, e que cada objeto seja explorado por durações semelhantes. Após 3 e 24 horas para avaliação da memória de curto e de longo prazo, respectivamente (VOGEL-CIERNIA; WOOD, 2014), os animais foram colocados novamente no campo aberto com a presença de três objetos, sendo um deles novo ao animal (com cor, forma e tamanho diferentes dos outros dois objetos). Considerou-se como exploração do objeto o ato de direcionar o nariz para o objeto a uma distância de não mais de 2 cm e/ou tocar o objeto com o nariz ou com a boca (MATHIASSEN; DICAMILLO, 2010; ŞIK *et al.*, 2003). Os ensaios foram gravados em vídeo durante 5 minutos e posteriormente analisados. Os parâmetros avaliados foram:

- a) tempo de interação (em segundos) com o objeto novo;
- b) tempo de interação (em segundos) com o objeto familiar.

4.4 Avaliação morfológica

4.4.1 Coleta do material

Ao final da quarta semana, os animais foram eutanasiados com solução de tiopental (60 mg/kg, via IP), sendo submetidos à perfusão intracardíaca com formol tamponado a 10% e coleta dos encéfalos, os quais permaneceram por um período de 72 horas na referida solução fixadora. Após, foram realizados cortes coronais para obtenção do hipocampo.

4.4.2 Estudo morfológico do tecido nervoso

A análise morfológica foi realizada por microscopia de luz a partir de cortes corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina, *luxol fast blue* e imuno-histoquímica para os marcadores astrocitário GFAP e microglial Iba1.

A marcação imuno-histoquímica foi realizada utilizando o método conjugado a uma cadeia de polímeros (*chain polymer-conjugated staining method*) (DAKO EnVision System). Foram utilizados como anticorpos primários imunoglobulina anti-GFAP policlonal de coelho (Z033401, Dako, Glostrup, Dinamarca) e anti-Iba1 policlonal de coelho (ab153696, Abcam, Cambridge, Massachusetts, EUA), seguidos pelo kit EnVision (EnVision+ Kit, HRP/Rabbit/DAB+, K4011, Dako, Glostrup, Dinamarca). Dez fotomicrografias de cada lâmina analisada foram feitas usando-se objetiva de 40x. Análise morfométrica dos cortes marcados por imuno-histoquímica foi realizada, utilizando o *index per area* do software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA) calibrado com filtros de cores digitais de forma que apenas células positivas sejam incluídas e a coloração de fundo seja excluída da medição. O *index per area* representa a proporção da área marcada em relação à área total da imagem, sendo 0, a completa ausência de marcação, e 1, a marcação total da área.

Não foram encontrados sinais de perda neuronal ou desmielinização em qualquer grupo.

4.5 Análise estatística

A homoscedasticidade foi verificada usando um F-teste ou teste de Bartlett e a normalidade, usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey, foi usada para análise dos resultados do teste do campo aberto e dados morfométricos. ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni foi usada para analisar o tempo de interação no NORT. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Em todos os casos, os resultados serão considerados como significativos se $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Comportamental

Tendo em vista que alterações na atividade motora podem interferir nos resultados das avaliações cognitivas, iniciamos o estudo avaliando os impactos dos tratamentos sobre tais parâmetros, por meio do teste de campo aberto avaliado no final da 3ª semana, com o objetivo de excluir diferenças entre os grupos. A aplicação do teste de campo aberto no final do experimento é uma estratégia para minimizar o estresse dos animais, evitando que a exposição prolongada ao ambiente do campo aberto interfira nos resultados dos testes anteriores. Os resultados indicaram que não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à locomoção total, locomoção periférica e frequência de levantar, sugerindo a ausência de impacto relevante de possíveis distúrbios motores nas avaliações cognitivas. Os dados obtidos estão apresentados na (Figura 1). NORT foi realizado 24 horas após o teste de campo aberto, na última semana do experimento, para avaliar a memória de reconhecimento sem a interferência de efeitos de aprendizagem ou memória adquiridos ao longo do período experimental. Os dados obtidos no NORT indicaram que os ratos tratados com DOX não apresentaram alteração no tempo de interação com o objeto novo em relação ao objeto previamente explorado, diferentemente do observado nos animais dos grupos controle, DON e DOX + DON, após 3 e 24 horas da fase de habituação. Os animais expostos à DOX apresentaram prejuízo na capacidade de distinguir entre objetos novos e familiares durante o NORT, em comparação aos grupos controle, DON e DOX + DON. Notavelmente, o co-tratamento com DON resultou em uma melhora significativa nos índices de preferência no NORT, em relação aos valores observados no grupo DOX (Figura 2). De forma geral, esses achados indicam que a administração de DON preveniu os déficits de memória e aprendizado de curto e longo prazo em ratos com *chemobrain* induzido por DOX.

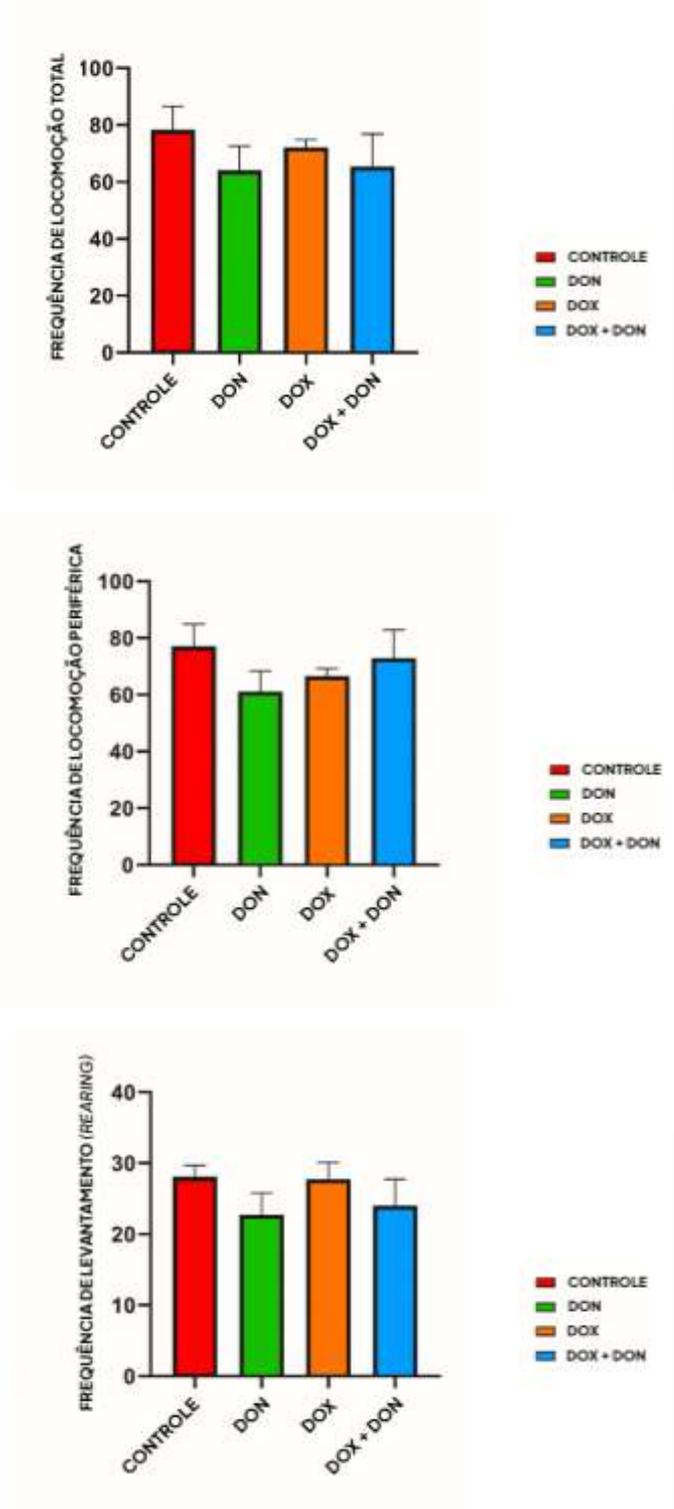


Figura 1 – Teste de campo aberto no dia 21 do estudo: grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorrubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorrubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). Os dados são expressos como média \pm EPM. $p > 0,05$ (ANOVA de uma via).

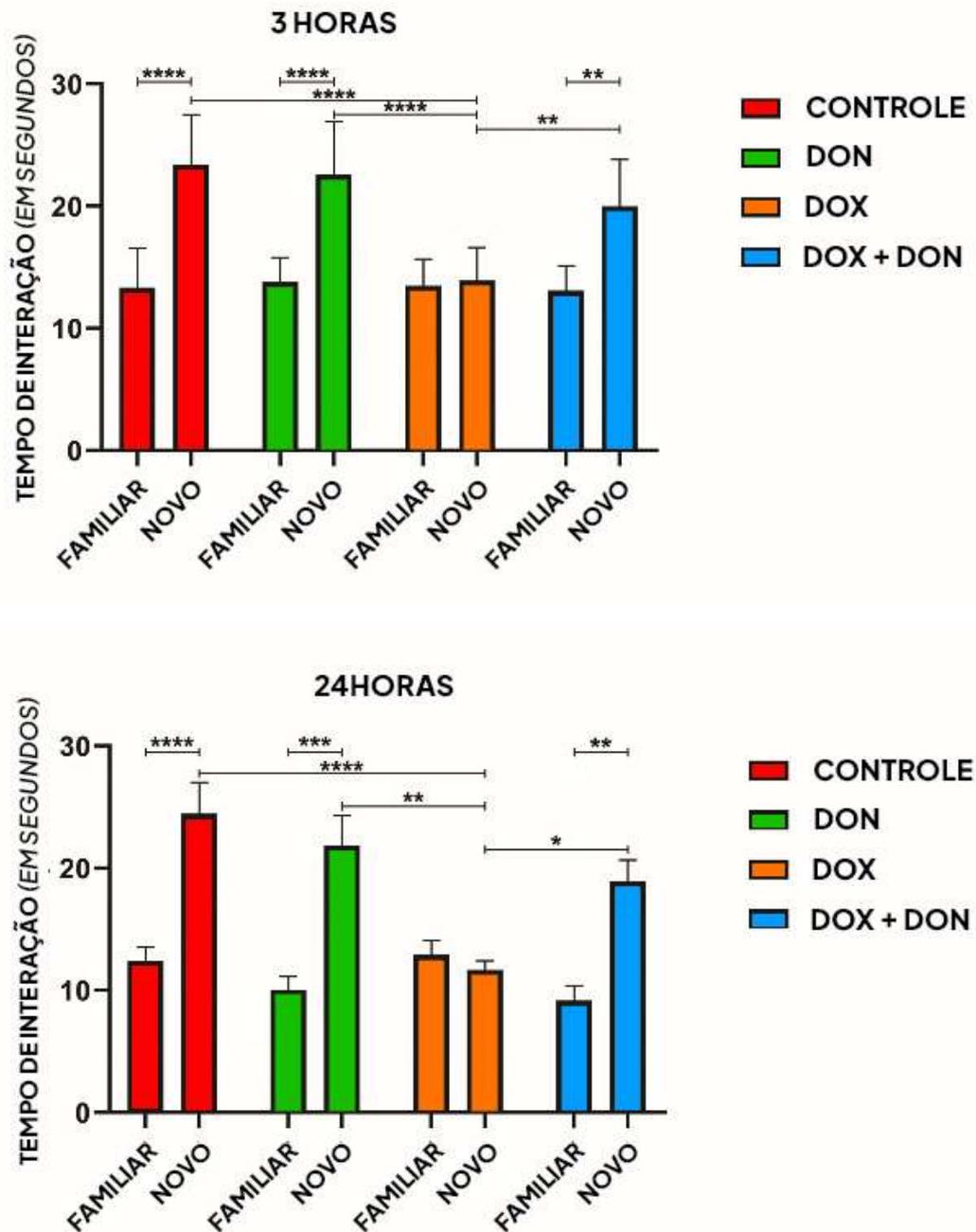


Figura 2 –Tempo de interação em segundos (s) com um objeto novo ou previamente explorado 3h e 24h após o período de habituação no teste de reconhecimento de objeto novo (NORT): grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorrubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorrubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). Os dados são expressos como média \pm EPM para o tempo de interação. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni).

5.2 Avaliação morfológica

Foi realizada uma análise morfométrica em cortes encefálicos submetidos à imuno-histoquímica, utilizando os marcadores Iba1 para micróglia e GFAP para astrócito. A ativação glial foi avaliada morfológicamente com base no índice *per area* de marcação. Os resultados relativos à resposta microglial e astrócitária na região CA1 hipocampo de cada grupo experimental estão apresentados nas Figura 4 e 6.

As análises imuno-histoquímicas revelaram que os animais tratados com DOX apresentaram aumento significativo na expressão dos marcadores gliais GFAP e Iba1, indicativos de ativação astrocitária e microglial, respectivamente, na região CA1 do hipocampo, em comparação aos grupos controle, DON, DOX + DON. Notavelmente, o grupo submetido ao co-tratamento (DOX + DON) demonstrou preservação dos parâmetros gliais, com níveis de expressão semelhantes aos observados nos grupos controle e DON isolado. Esse efeito foi caracterizado como prevenção da astrogliose e da microgliose induzidas por DOX, conforme evidenciado nas Figura 4 e 6, respectivamente. Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica de GFAP de astrócitos e de Iba1 microglial nos distintos grupos, são mostradas, respectivamente, nas Figura 3 e 5.

De modo geral, esses resultados sugerem que a administração de DOX promoveu alterações morfológicas evidentes na micróglia e nos astrócitos, refletindo um estado de hiperativação glial na região do hipocampo. Tais alterações estruturais, sugestivas de processo neuroinflamatório, foram significativamente atenuadas pelo tratamento com DON, indicando seu potencial modulador sobre a neuroinflamação induzida pela quimioterapia.

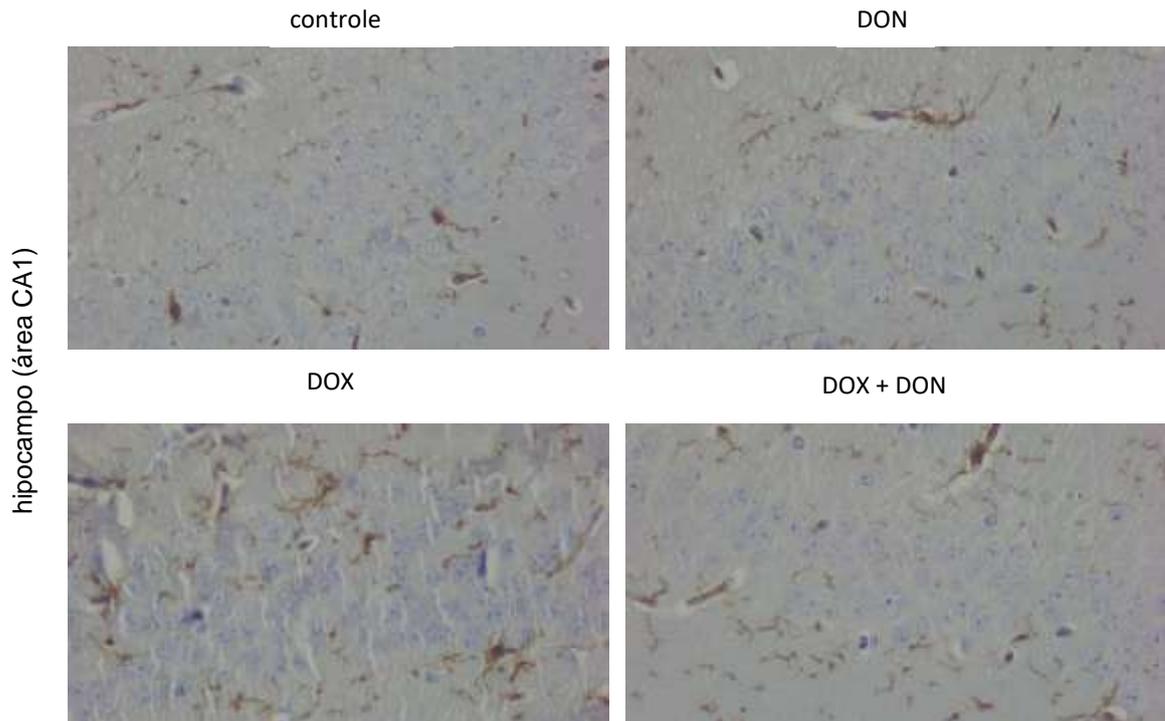


Figura 3 – Fotomicrografias representativas da marcação de imuno-histoquímica de Iba1 no hipocampo (área CA1) de ratos, tratados conforme os seguintes grupos experimentais: grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). As imagens foram obtidas com objetiva de 40x.

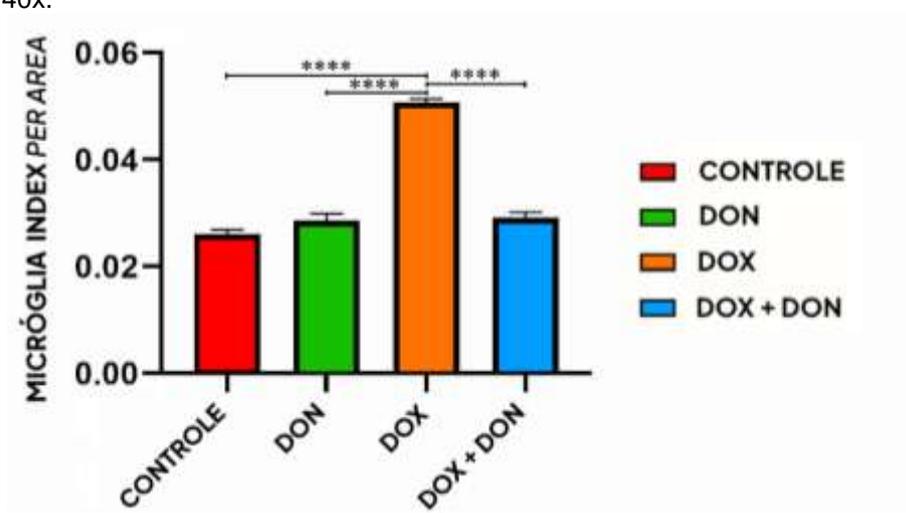


Figura 4 – Expressão micrógliia Iba1 no hipocampo (área CA1) de ratos, tratados conforme os seguintes grupos experimentais: grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). Os dados são expressos como média ± EPM. **** $p < 0,0001$ (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). O índice de micrógliia por área representa a proporção da área marcada em relação à área total da imagem, sendo 0 a completa ausência de marcação e 1 a marcação total da área.

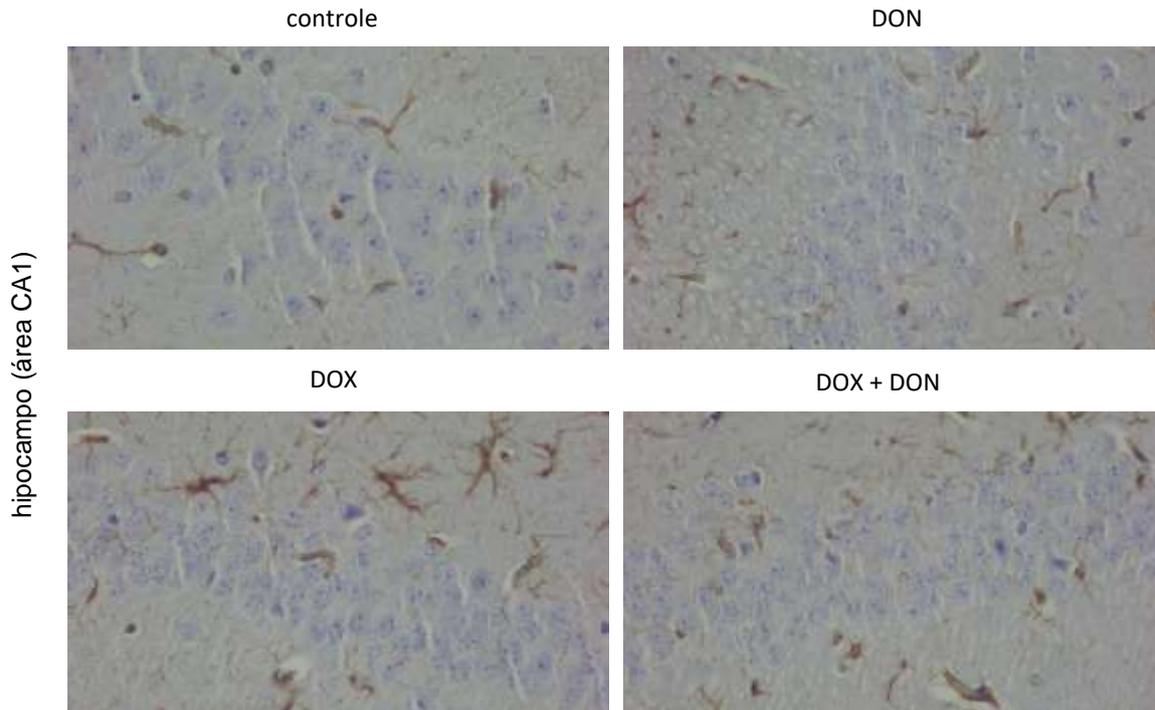


Figura 5 – Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para GFAP no hipocampo (área CA1) de ratos, tratados conforme os seguintes grupos experimentais: grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). As imagens foram obtidas com objetiva de 40x.

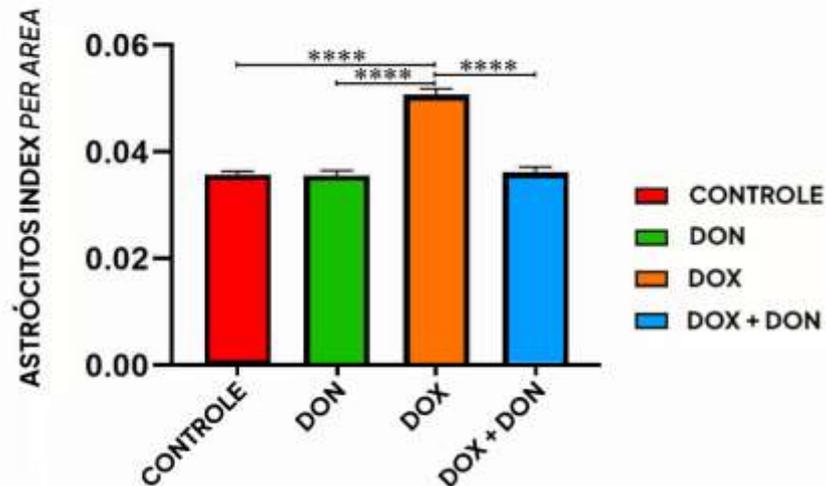


Figura 6 – Expressão astrocitária da GFAP do hipocampo (área CA1) de ratos, conforme os seguintes grupos experimentais: Grupo controle (ratos injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); DON (injetados com solução salina 0,9% por via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com água destilada por gavagem diária durante 3 semanas); grupo DOX + DON (injetados com doxorubicina, 2,5 mg/kg/semana, por 3 semanas, via i.p. e tratados com donepezil, 5 mg/kg, por gavagem diária durante 3 semanas). Os dados são expressos como média \pm EPM. **** $p < 0,0001$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). O índice de astrócitos por área representa a proporção da área corada em relação à área total da imagem, sendo 0 a ausência completa de coloração e 1 a coloração total da área.

6 DISCUSSÃO

O NORT foi utilizado para avaliar a função cognitiva de curto e longo prazo. Os animais tratados com DOX apresentaram déficits significativos de memória e aprendizado, demonstrados por uma redução significativa no índice de preferência pelo objeto novo, tanto após 3 horas quanto 24 horas da fase de habituação. Esses dados corroboram que a DOX compromete o desempenho cognitivo, sem afetar a locomoção, conforme evidenciado também por CARDOSO *et al.*, (2020); ONGNOK *et al.*, (2021a); McALPIN *et al.*, (2022). Tais achados reforçam a confiabilidade do modelo experimental e o papel da DOX como agente neurotóxico capaz de causar comprometimento das funções cognitivas.

Considerando a relevância das células gliais na mediação da neuroinflamação, foi realizada a análise morfométrica da micróglia e dos astrócitos na região CA1 do hipocampo, por meio da quantificação da expressão de Iba-1 e GFAP, respectivamente. A administração de DOX resultou em aumento significativo da imunorreatividade para Iba-1 em comparação ao grupo controle e ao grupo DON, indicando ativação microglial robusta. A coadministração de DON (grupo DOX + DON) atenuou significativamente essa ativação, com redução da expressão de Iba-1 em relação ao grupo DOX, retornando os níveis aos observados nos grupos controle e DON isolado.

Resultados semelhantes foram observados para a expressão astrocitária. O grupo DOX apresentou aumento significativo nos níveis de GFAP em comparação aos grupos controle e DON, caracterizando intensa reatividade astrocitária. A coadministração de DON reduziu significativamente essa expressão em relação ao grupo DOX, sem diferenças significativas em relação aos grupos controle e DON isolado, sugerindo potente ação anti-inflamatória da DON também sobre astrócitos.

Esses achados reforçam a hipótese de que a DON exerce efeitos neuroprotetores por meio da modulação da resposta inflamatória glial. Do ponto de vista farmacodinâmico, a inibição da acetilcolinesterase pelo DON eleva a disponibilidade sináptica de ACh, o que favorece a ativação sustentada dos receptores $\alpha 7$ nicotínicos de acetilcolina ($\alpha 7nAChRs$), expressos em micróglia e astrócitos. A ativação desses receptores está associada à inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, supressão da via inflamatória como o fator de

transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e ativação da via antioxidante do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), culminando em efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores (LI *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2023).

Além dos benefícios cognitivos e gliais observados, a administração de DON (5 mg/kg) apresentou perfil de segurança favorável. Não foram identificadas alterações comportamentais adversas, redução da ingestão alimentar ou sinais de toxicidade sistêmica. A dose utilizada está de acordo com estudos pré-clínicos prévios que demonstraram eficácia do DON em modelos de *chemobrain* (SHIN *et al.*, 2018; ONGNOK *et al.*, 2021a). Ainda assim, deve-se considerar que, embora a segurança tenha sido confirmada em roedores, efeitos colaterais gastrointestinais, como diarreia e desconforto abdominal, são comumente relatados em estudos com modelos animais (NGUYEN *et al.*, 2021).

Enquanto o estudo de Ongnok *et al.* (2021a) demonstrou os efeitos neuroprotetores do DON frente às alterações cognitivas e inflamatórias induzidas pela DOX, não foram observadas alterações significativas na imunorreatividade de GFAP nos diferentes grupos experimentais, sugerindo que a ativação astrocitária não foi um componente marcante nesse modelo. Em contraste, os resultados do presente estudo revelaram um aumento significativo da expressão de GFAP no hipocampo dos animais tratados com DOX, acompanhado por uma redução significativa após a coadministração de DON, indicando uma ação moduladora do fármaco também sobre a reatividade astrocitária. Essa discrepância pode estar relacionada a diferenças metodológicas, ao tempo de exposição ou à sensibilidade regional da resposta glial. Tais dados reforçam a hipótese de que os astrócitos participam ativamente da neuroinflamação induzida pela DOX e que o DON pode exercer efeitos anti-inflamatórios amplos, não restritos à microglia.

Como limitação metodológica, destaca-se a inclusão exclusiva de ratos machos. Estudos recentes demonstram que hormônios sexuais, como os estrógenos, exercem papel imunomodulador relevante, influenciando a ativação glial e a expressão de receptores $\alpha 7$ nAChRs (VILLA *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2023). Dessa forma, futuras investigações devem contemplar ambos os sexos, a fim de ampliar a validade translacional dos achados e identificar possíveis variações de sensibilidade ao tratamento com anticolinesterásicos.

Apesar dos benefícios observados em modelos animais, os dados clínicos em humanos permanecem inconclusivos. O estudo WF-97116, conduzido por Rapp *et al.*

(2024), é um exemplo relevante: um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo que investigou o uso do DON em 276 sobreviventes de câncer de mama com queixas cognitivas após quimioterapia adjuvante. Embora o DON tenha sido bem tolerado e a adesão ao tratamento cuidadosamente monitorada por meio de diários de medicação e contatos regulares com a equipe médica, não foram observadas melhorias significativas nos escores de memória, funções executivas ou autoavaliação cognitiva após 24 semanas de tratamento. Esses resultados indicam que, apesar da plausibilidade biológica e dos efeitos promissores observados em modelos animais, a tradução clínica do uso do DON ainda enfrenta limitações.

Um ponto metodológico relevante refere-se ao momento da administração do DON. No ensaio clínico WF-97116, o DON foi introduzido tardiamente, após o término do protocolo quimioterápico, em pacientes que já apresentavam queixas cognitivas. Tal estratégia pode limitar os efeitos do tratamento, uma vez que processos como neuroinflamação e estresse oxidativo, induzidos pela DOX, tendem a se consolidar ao longo do tempo, dificultando a reversão do quadro uma vez estabelecido. Em contrapartida, no presente estudo experimental, a administração do DON foi iniciada concomitantemente à exposição à DOX, permitindo uma intervenção precoce durante a janela crítica de instalação do dano neurotóxico. Tal abordagem é embasada por evidências farmacocinéticas que indicam que o DON atinge um estado de equilíbrio plasmático após cerca de 15 dias de uso contínuo (KUMAR *et al.*, 2023) e por dados fisiopatológicos que sugerem que a prevenção da neuroinflamação pode ser mais eficaz do que sua reversão posterior (CAVALETTI; ALBERTI; MARMIROLI, 2015). Assim, este modelo experimental propõe que a eficácia do DON como agente neuroprotetor depende não apenas de sua presença, mas do momento em que ele é introduzido em relação ao insulto neurotóxico, trazendo contribuições relevantes para a interpretação de estudos clínicos e para o delineamento de novas estratégias terapêuticas em humanos.

Em síntese, os achados do presente estudo sustentam o potencial do DON como agente neuroprotetor no contexto do *chemobrain* induzido por DOX, com efeitos positivos sobre a performance cognitiva e modulação da resposta glial. A ativação da via colinérgica anti-inflamatória emerge como um possível mecanismo terapêutico promissor. No entanto, a extrapolação dos dados para a prática clínica requer cautela, diante das limitações do modelo animal, do dimorfismo sexual e da escassez de evidências clínicas consistentes.

Recomenda-se que estudos futuros considerem variáveis sexuais, hormonais e genéticas, além da adoção de protocolos clínicos robustos e controlados. Tais esforços são essenciais para validar o uso de anticolinesterásicos no tratamento do *chemobrain* e, assim, contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras, com impacto direto na qualidade de vida de pacientes oncológicos.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou que a DOX comprometeu significativamente as funções de aprendizado e memória, tanto de curto quanto de longo prazo, além de ter induzido astrogliose e microgliose. Por sua vez, o uso de DON, um inibidor da acetilcolinesterase, demonstrou efeitos neuroprotetores, evidenciados pela melhora cognitiva e pela prevenção da ativação glial, no contexto do *chemobrain* induzido pela DOX. Esses achados destacam o potencial terapêutico do DON como uma estratégia promissora para prevenir ou minimizar os impactos neurológicos em pacientes oncológicos.

REFERÊNCIAS

- AMARO-LEAL, Â.; AFONSO, A. I.; MACHADO, F.; SHVACHIY, L.; ROCHA, I.; OUTEIRO, T. F.; GERALDES, V. Dose-Dependent cognitive decline, anxiety, and locomotor impairments induced by doxorubicin: evidence from an animal model. **Biology**, v. 13, n. 939, p. 1-15, 2024.
- BASSELIN, M.; NGUYEN, H. N.; CHANG, L.; BELL, J. M.; RAPOPORT, S. I. Acute, but not chronic, donepezil increases muscarinic receptor-mediated signaling via arachidonic acid in unanesthetized rats. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 17, n. 2, p. 369–382, 2009.
- CALDARONE, B. J.; ZACHARIOU, V.; KING, S. L. Rodent models of treatment-resistant depression. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 51-65, 2015.
- CARDOSO, C. V.; DE BARROS, M. P.; BACHI, A. L.; BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; DE FÁTIMA MONTEIRO MARTINS, M.; ROCHA, P. R. D.; DA SILVA RODRIGUES, P.; BONDAN, E. F. Chemobrain in rats: Behavioral, morphological, oxidative and inflammatory effects of doxorubicin administration. **Behavioural Brain Research**, v. 378, p. 112233, 2020.
- CAVALETTI, G.; ALBERTI, P.; MARMIROLI, P. Chemotherapy-Induced Peripheral Neurotoxicity in Cancer Survivors: an underdiagnosed clinical entity?. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 35, p. 553–560, 2015.
- CIBELLI, M.; FIDALGO, A. R.; TERRANDO, N.; MA, D.; MONACO, C.; FELDMANN, M.; TAKATA, M.; LEVER, I. J.; NANCHAHAL, J.; FANSELOW, M. S. Role of interleukin-1 β in postoperative cognitive dysfunction. **Annals of Neurology**, v. 68, n. 3, p. 360-368, 2010.
- CUTULI, D.; DE BARTOLO, P.; CAPORALI, P. Neuroprotective effects of donepezil against cholinergic depletion **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 5, n. 50, p. 1-18, 2013.
- EL-AGAMY, D. S.; NAZMY, M. H.; KHALIFA, A. E. Doxorubicin-induced neurotoxicity: possible role of TNF- α and NF- κ B and protective effect of berberine. **Neurotoxicity Research**, v. 32, n. 3, p. 435-445, 2017
- GORDON, S. M.; HOFMANN, S.; ASKEW, D. S.; DAVIDSON, W. S. High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 9-15, 2011.
- HOWES, L. G. Cardiovascular effects of drugs used to treat Alzheimer's disease. **Drug Safety**, v. 37, n. 6, p. 391-395, 2014.
- HUANG, Q.; LIAO, C; GE, F.; AO, J.; LIU, T. Acetylcholine bidirectionally regulates learning and memory. **Journal of Neurorestoratology**, v. 10, n. 2, p. 100002, 2022.
- KERKMANN, M.; SCHMIDT, H.; MEYER, B.; LANGE, M.; WAGNER, S. Chemotherapy-induced cognitive impairment in breast cancer patients: from clinical observations to neurobiological mechanisms. **Journal of Neuro-oncology**, v. 162, n. 1, p. 1-13, 2024.
- KIM, J.; LEE, H.-J.; PARK, S. K.; PARK, J.-H.; JEONG, H.-R.; LEE, S.; LEE, H.; SEOL, E.; HOE, H.-S. Donepezil regulates LPS and A β -Stimulated neuroinflammation

through MAPK/NLRP3 inflammasome/STAT3 signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10637, 2021.

KOSASA, T.; YAMANISHI, Y.; KITA, Y.; UEDA, T. Inhibitory effect of E2020 (donepezil hydrochloride) on acetylcholinesterase activity in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 380, n. 1, p. 1–7, 1999.

KUMAR, A.; GUPTA, V.; SHARMA, S. Donepezil. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2023.

KWON, M; KOH, S. Cognitive dysfunction associated with cancer and cancer treatment: mechanisms and implications. **Translational Neurodegeneration**, v. 9, n. 42, p. 1-12, 2020.

LI, S.; ZHOU, B.; LIU, B.; ZHOU, Y.; ZHANG, H.; LI, T.; ZUO, X. Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates arthritis via suppression of macrophage migration. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 2, p. 711–718, 2016.

LIU, H.; ZHANG, X.; SHI, P.; GUO, Y.; LIU, Q.; WU, H.; JIA, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, L. $\alpha 7$ Receptor nicotínico de acetilcolina: um receptor-chave na via antiinflamatória colinérgica que exerce um efeito antidepressivo. **Journal of Neuroinflammation**, v. 20, n. 84, p. 1-19, 2023.

LUEPTOW, L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 55718, n. 126, p. 1-9, 2017.

MATHIASSEN, J. R.; DICAMILLO, A. Novel object recognition in the Rat: A facile assay for cognitive function. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 5.59.1-5.59.15, 2010.

McALPIN, B. R.; MAHALINGAM, R.; SINGH, A. K.; DHARMARAJ, S.; CHRISIKOS, T. T.; BOUKELMOUNE, N.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C. J. HDAC6 inhibition reverses long-term doxorubicin-induced cognitive dysfunction by restoring microglia homeostasis and synaptic integrity. **Theranostics**, v. 12, n. 2, p. 603-619, 2022.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem compound summary for CID 5741, Donepezil hydrochloride. 2022.

NGUYEN V., SALLBACH J, SANTOS G. M, ENDRES K. Influence of acetylcholine esterase inhibitors and memantine, clinically approved for Alzheimer's dementia treatment, on intestinal properties of the mouse. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1-13, 2021.

ONGNOK, B.; KHUANJING, T.; CHUNCHAI, T.; PANTIYA, P.; KERDPHOO, S.; ARUNSAK, B.; NAWARA, W.; JAIWONGKAM, T.; APAIJAI, N.; CHATTIPAKORN, N. Donepezil protects against doxorubicin-induced chemobrain in rats via attenuation of inflammation and oxidative stress without interfering with doxorubicin efficacy. **Neurotherapeutics**, v. 18, n. 3, p. 2107-2125, 2021a.

ONGNOK, B.; KHUANJING, T.; CHUNCHAI, T.; KERDPHOO, S.; JAIWONGKAM, T.; CHATTIPAKORN, N.; CHATTIPAKORN, S. C. Donepezil provides neuroprotective effects against brain injury and Alzheimer's pathology under conditions of cardiac ischemia/reperfusion injury. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 1, p. 165975, 2021b.

PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RAPP, S. R.; DRESSLER, E. V.; BROWN, W. M.; WADE, J. L. III; LE-LINDQWISTER, N.; KING, D.; ROWLAND, K. M.; WEAVER, K. E.; KLEPIN, H. D.; SHAW, E. G.; LESSER, G. J. Phase III Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of Donepezil for Treatment of Cognitive Impairment in Breast Cancer Survivors After Adjuvant Chemotherapy (WF-97116). **Journal of Clinical Oncology**, v. 42, n. 21, p. 2546-2557, 2024.

SHEN, H; KIHARA, T; HONGO, H; WU, X; KEM, Wr; SHIMOHAMA, S; A AKAIKE, NIIDOME, T; SUGIMOTO, H. Neuroprotection by donepezil against glutamate excitotoxicity involves stimulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors and internalization of NMDA receptors. **British Journal Of Pharmacology**, v. 161, n. 1, p. 127-139, 2010.

SHIN, C. Y.; KIM, H.-S.; CHA, K.-H.; WON, D. H.; LEE, J.-Y.; JANG, S. W.; SOHN, U. D. The effects of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, on impaired learning and memory in rodents. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 274-281, 2018.

ŠIMŮNEK T, STÉRBA M, POPELOVÁ O, ADAMCOVÁ M, HRDINA R, GERSL V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 1, p. 154–171, 2009.

SUTTHAPITAKSAKUL, L.; DASS, C. R.; SRIAMORNSAK, P. Donepezil—an updated review of challenges in dosage form design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 63, p. 102549, 2021.

TAKADA-TAKATORI, Y; KUME, T; OHGI, Y; FUJII, T; NIIDOME, T; SUGIMOTO, H; AKAIKE, A. Mechanisms of $\alpha 7$ -nicotinic receptor up-regulation and sensitization to donepezil induced by chronic donepezil treatment. **European Journal Of Pharmacology**, v. 590, n. 1-3, p. 150-156, 2008.

UNITED STATES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Donepezil (Aricept): prescribing information. Silver Spring, MD: FDA, 2018.

UNITED STATES. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Donepezil (Aricept): prescribing information. Silver Spring, MD: FDA, 2022.

VILLA A, VEGETO E, POLETTI A, MAGGI A. Estrogens, neuroinflammation, and neurodegeneration. **Endocrine Reviews**, v.37 n. 4, p. 372-402, 2016.

VOGEL-CIERNIA, A.; WOOD, M. A. Examining object location and object recognition memory in mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 69, n. 1, p 8.31.1–8.31.17, 2014.

WHITTAKER, ALEXANDRA L.; GEORGE, REBECCA P.; O'MALLEY, LUCY. Prevalence of cognitive impairment following chemotherapy treatment for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2135, 2022.

WILKINSON, D. G. The pharmacology of donepezil: a new treatment of Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 1, n. 1, p. 121-135,1999.

WU, Y.; DANG, R.; TANG, M.; CAI, H.; LI, H.; LIAO, D.; HE, X.; CAO, L.; XUE, Y.; JIANG, P. Long chain omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation alleviates doxorubicin-induced depressive-like behaviors and neurotoxicity in rats: involvement of oxidative stress and neuroinflammation. **Nutrients**, v. 8, n. 4, p. 1-15, 2016.

ZHONG, XIAOJUN; SUN, YULIN; LU, YAJUN; XU, LEI. Immunomodulatory role of estrogen in ischemic stroke: neuroinflammation and effect of sex. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1-11, 2023.

ANEXO

Anexo 1 — Comprovante de aprovação do projeto junto ao CEUA - UNIP

 UNIVERSIDADE PAULISTA	Universidade Paulista Comissão de Ética no Uso de Animais												
CERTIFICADO													
<p>Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MORFOLÓGICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE DONEPEZIL E DE METFORMINA EM RATOS WISTAR COM DISFUNÇÃO COGNITIVA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA.", protocolada sob o CEUA nº 5070220324 (ID 001123), sob a responsabilidade de Eduardo Fernandes Bondan e equipe; Eurides Nascimento Dias - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 10/04/2024.</p>													
<p>We certify that the proposal "STUDY OF THE BEHAVIORAL AND MORPHOLOGICAL EFFECTS OF DONEPEZIL AND METFORMIN ADMINISTRATION IN WISTAR RATS WITH DOXORUBICIN-INDUCED COGNITIVE DYSFUNCTION.", utilizing 60 Heterogenics rats (60 males), protocol number CEUA 5070220324 (ID 001123), under the responsibility of Eduardo Fernandes Bondan and team; Eurides Nascimento Dias - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was APPROVED by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 04/10/2024.</p>													
Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)													
Vigência da Proposta: de 06/2024 a 06/2025 Área: Medicina Veterinária													
<table border="0"> <tr> <td>Origem: Biotério de Experimentação</td> <td>sexo: Machos</td> <td>idade: 3 a 5 meses</td> <td>Quantidade: 60</td> </tr> <tr> <td>Espécie: Ratos heterogênicos</td> <td></td> <td>Peso: 200 a 300 g</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Linhagem: ratos Wistar</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>		Origem: Biotério de Experimentação	sexo: Machos	idade: 3 a 5 meses	Quantidade: 60	Espécie: Ratos heterogênicos		Peso: 200 a 300 g		Linhagem: ratos Wistar			
Origem: Biotério de Experimentação	sexo: Machos	idade: 3 a 5 meses	Quantidade: 60										
Espécie: Ratos heterogênicos		Peso: 200 a 300 g											
Linhagem: ratos Wistar													
São Paulo, 24 de maio de 2024													
 Profa. Dra. Maria Martha Bernardi Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Paulista	 Prof. Dr. José Guilherme Xavier Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Paulista												
Rua Doutor Bacelar, 1212 - Vila Clementino - São Paulo/SP - CEP 04026-002 - tel: 55 (11) 5586-4090 Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8 às 18h : e-mail: ceua@unip.br CEUA N 5070220324													
													