

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**EDILENE PIRES DE GODOY VAZI**

**EFEITOS MORFOLÓGICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CURTA DURAÇÃO DO  
METOTREXATO SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS**

**SÃO PAULO  
2019**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**EDILENE PIRES DE GODOY VAZI**

**EFEITOS MORFOLÓGICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CURTA DURAÇÃO DO  
METOTREXATO SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS**

Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Paulista - UNIP, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob a orientação do professor Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

**SÃO PAULO  
2019**

**EDILENE PIRES DE GODOY VAZI**

**EFEITOS MORFOLÓGICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CURTA DURAÇÃO DO  
METOTREXATO SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS**

Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Paulista - UNIP, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob a orientação do professor Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

**Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_**

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Monteiro Martins – Universidade Paulista - UNIP

---

Profa. Dra. Luciana Pugliese da Silva – Centro Universitário São Camilo

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este ao meu amor José Roberto Vazi (*in memoriam*), pois sempre esteve na primeira fileira da vida para me aplaudir.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela mente e intelectos lúcidos e ativos.

Agradeço aos meus pais Luiz e Jacy (*in memoriam*), por plantarem em mim a semente do amor ao aprendizado constante e pela busca da excelência.

Agradeço às minhas filhas Carolina, Sarah, Carina e Bárbara; aos meus genros Raphael, Guilherme, Max e Lucas e meus netos Paulo, Rebecca, Joseph e Miguel pelo incentivo, apoio, paciência e amor recebido durante este processo de aprendizado.

Agradeço aos professores da pós-graduação da UNIP pela oportunidade que me deram de realizar esse sonho. Pelo apoio e pela torcida. Também por me permitirem estar próxima de pessoas tão inteligentes e tão humanas.

Agradeço ao meu orientador, Eduardo Fernandes Bondan, pela confiança que depositou em mim e pela paciência em me ajudar neste processo.

Agradecimento especial á Carolina Vieira por toda a ajuda com as fotomicrografias, gráficos e ajustes e á Natália Almeida pela parceria nos passos do projeto.

Sou grata também aos amigos Thais Cristina, Karina Silva, Renata Larocca e Thalita Serrano que me incentivaram, ajudaram, torceram e comemoraram cada pequeno sucesso.

## RESUMO

O metotrexato (MTX), uma droga antifolato, é amplamente utilizado em protocolos quimioterápicos para tumores cerebrais primários e metastáticos e algumas doenças autoimunes. Sua eficácia para tumores, porém, é limitada pela alta incidência de complicações neurológicas no sistema nervoso central (SNC), embora o mecanismo patogênico e o(s) alvo(s) celular(es) da neurotoxicidade do MTX ainda sejam desconhecidos. Este estudo teve como objetivo observar a resposta astrocitária à administração sistêmica de curto prazo de MTX em ratos adultos. Ratos Wistar machos receberam 5 ou 10 mg/kg/dia de MTX por via intraperitoneal por 4 dias consecutivos (respectivamente, grupos MTX5 e MTX10) ou o mesmo volume de solução salina a 0,9% (controle). No 5º dia, amostras de encéfalo foram coletadas e processadas para as colorações de hematoxilina-eosina e de *luxolfast blue*, bem como para investigação imuno-histoquímica da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e análise morfométrica no córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e camadas molecular/granular do cerebelo. Os níveis encefálicos das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram determinados por ELISA. Nenhum sinal de perda neuronal ou de desmielinização foi observado nos diferentes grupos. O aumento da expressão de GFAP foi encontrado em todas as áreas dos grupos MTX, sendo ligeiramente maior no grupo MTX10. Os níveis encefálicos de ambas citocinas diminuíram no grupo MTX5 em relação aos controles. No grupo MTX10, o TNF- $\alpha$  diminuiu, embora a IL-1 $\beta$  estivesse aumentada em comparação aos controles. A administração do MTX induziu a astrogliose em várias áreas do encéfalo. No grupo MTX5, aparentemente ocorreu na presença de citocinas pró-inflamatórias diminuídas.

**Palavras-chave:** astrócitos, *chemobrain*, citocinas, GFAP, metotrexato, quimioterapia

## ABSTRACT

Methotrexate (MTX), an antifolate drug, is widely used in chemotherapeutic protocols for metastatic and primary brain tumors and some autoimmune diseases. Its efficacy for brain tumors is limited by the high incidence of central nervous system (CNS) complications, although the mechanism and cellular target(s) of its neurotoxicity are still unclear. This investigation aimed to observe astrocytic response to systemic short-term MTX administration in adult rats. Male Wistar rats received 5 or 10 mg/kg/day of MTX by intraperitoneal route for 4 consecutive days (respectively, MTX5 and MTX10 groups) or the same volume of 0.9% saline solution (control group). On the 5<sup>th</sup> day, brain samples were collected for hematoxylin-eosin and luxol fast blue staining techniques, as well as for glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry and morphometric analysis in the frontal cortex, hippocampus, hypothalamus and molecular/granular layers of the cerebellum. Brain levels of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were determined by Elisa. No signs of neuronal loss or demyelination were observed in all groups. Increased GFAP expression was found in all areas from the MTX groups, although it was slightly higher in the MTX10 group compared to the MTX5. Both TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were decreased in the MTX5 group compared to controls. In the MTX10 group, TNF- $\alpha$  decreased, although IL-1 $\beta$  was increased relative to controls. MTX administration induced astrogliosis in several CNS areas. In the MTX5 group, it apparently occurred in the presence of decreased proinflammatory cytokines.

**Key words:** astrocytes, chemobrain, chemotherapy, cytokines, GFAP, methotrexate

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1 Quimioterapia.....	13
2.2 Metotrexato (MTX) .....	15
2.3 Mecanismo de ação do MTX.....	16
2.4 <i>Chemobrain</i> .....	19
2.5 Astrócitos .....	20
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
5.1 Delineamento experimental.....	27
5.2 Coloração hematoxilina-eosina (HE).....	28
5.3 Técnica de <i>luxol fast blue</i> .....	28
5.4 Marcação imuno-histoquímica para GFAP.....	28
5.5 Determinação de níveis encefálicos de citocinas (ELISA) .....	29
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A quimioterapia vem sendo muito eficaz no tratamento de numerosas formas do câncer, levando a um melhor prognóstico da doença. No entanto, a mesma pode ser extremamente danosa para as demais células hígidas, uma vez que não atinge somente as células tumorais. Estudos apresentam relatos de uma série de efeitos adversos, entre eles, a disfunção cognitiva ou também chamada de *chemobrain* (AHLES et al., 2012)

Não se sabe ao certo os motivos que causam o *chemobrain* e nem por quanto tempo ele persiste. Há relatos de pacientes que melhoraram após um curto período de tempo e outros em que o problema persistiu por anos (MEYERS et al., 1995). Normalmente, o *chemobrain* se inicia durante o tratamento com o quimioterápico, mas há relatos de pacientes que apresentaram após o término do tratamento e com um agravo constante da disfunção cognitiva (WIENEKE; DIENST, 1995).

Acredita-se que o fenômeno seja multifatorial, sendo a depressão, os fármacos esteroidais utilizados juntos com o quimioterápico, o estresse, a ansiedade, a má qualidade de vida, a fadiga, as deficiências nutricionais, o estresse oxidativo celular e fatores genéticos alguns dos contribuintes para sua ocorrência (KEIME-GUIBERT et al., 1998).

O metotrexato (MTX) é um antimetabólito usado no tratamento do câncer e de doenças autoimunes, sendo classificado como um antagonista do ácido fólico (McGUIRE, 2003). Este fármaco vem sendo utilizado para o tratamento de várias neoplasias, incluindo leucemias, linfomas, carcinomas, osteossarcomas, meningites neoplásicas e tumores cerebrais e de pescoço (MAHONEY et al., 1998; McGUIRE, 2003; OMURO et al., 2005), além de ser usado como agente antiinflamatório e imunossupressor em doenças autoimunes, como artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla e na supressão de rejeição a transplantes (KIM et al., 2018; KEARNEY et al., 2019).

Não se sabe ao certo por qual mecanismo de ação o MTX induz sua neurotoxicidade, porém acredita-se que seja um processo multifatorial (QUINN et al., 1997; NIGRO et al., 2000; VEZMAR et al., 2003). Uma possível causa seria pelo aumento das concentrações de homocisteína, frente à inibição do tetra-hidrofolato no SNC. Uma vez que a mesma é tóxica para o endotélio vascular, promovendo a

formação de trombos, poderia, assim, ser a responsável pela microangiopatia mineralizante e pela isquemia da substância branca observadas em pacientes intoxicados pelo MTX (DRACHTMAN et al., 2002; KISHI et al., 2003). Além disso, o excesso de homocisteína pode ser metabolizado para neurotransmissores de aminoácidos excitatórios contendo enxofre, que são agonistas endógenos dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), podendo causar morte neuronal e sequelas associadas às propriedades excitotóxicas do MTX. Juntos, esses eventos poderiam justificar a patogênese da neurotoxicidade e das convulsões observadas (QUINN et al., 1997; DRACHTMAN et al., 2002; VEZMAR et al., 2003).

Em casos de pacientes portadores de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e tratados com MTX, são observadas alterações cognitivas significativas (PECKHAM et al., 1988; UEBERALL et al., 1997; WABER et al., 2001; RIVA et al., 2002; CORREA et al., 2004). Em crianças com LLA tratadas com terapia intratecal e radioterapia craniana, observou-se que as mesmas obtiveram escores de quociente de inteligência (QI) menores que o esperado, com dificuldade de concentração e de compreensão também relatadas durante os testes de desempenho padronizados (WABER et al., 2001; RIVA et al., 2002; REDDICK et al., 2014; WALSH et al., 2015).

Estudo em ratos usando injeção intratecal de MTX revelou aumento das concentrações de homocisteína no líquor e uma redução na memória espacial dos animais, porém sem alteração em testes de avaliação de comportamento e coordenação motora (LI et al., 2010b).

Após múltiplas aplicações intracerebroventriculares de MTX em ratos, notou-se o aparecimento de disfunção cognitiva, incluindo déficits de memória e aprendizado, além de convulsões e redução das concentrações das monoaminas norepinefrina, dopamina e serotonina no SNC. Dessa forma, uma possível hipótese seria considerar que o prejuízo cognitivo causado pelo MTX fosse decorrente da alteração nos níveis dessas monoaminas (MADHYASTHA et al., 2002). Sabe-se que o uso da fluoxetina reduz parcialmente os efeitos causados pela quimioterapia com MTX, agindo na memória espacial e na proliferação de precursores neurais envolvidos na neurogênese hipocampal de ratos. Ratos que receberam fluoxetina após a administração do MTX tiveram sua habilidade cognitiva restaurada (LYONS et al., 2012).

No SNC de mamíferos, os astrócitos constituem as células em maior número presentes, ultrapassando o número de neurônios na proporção de 10:1 (BENVENISTE, 1992; SOFRONIEW, 2010). Apesar de toda sua variação morfológica e bioquímica, caracterizam-se pela presença de prolongamentos dotados de filamentos chamados de fibrilas gliais, sendo a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) seu componente principal, servindo como meio de identificação em estudos *in situ* e em cultivo (MONTGOMERY, 1994; MIDDELDORP; HOL, 2011).

Dentre as funções dos astrócitos destacam-se a manutenção da homeostasia no microambiente neural, a detoxificação, a recaptação de neurotransmissores, a regulação do pH, da osmolaridade e das concentrações iônicas do tecido nervoso. Os astrócitos ainda dão suporte mecânico aos oligodendrócitos durante a mielinização e participam do processo de reparo por cicatrização após injúria, assim como fazem a síntese de moléculas de adesão, promovem crescimento de neurônios, realizam indução e manutenção das características da barreira hematoencefálica (BHE), fazem fagocitose de restos celulares, desempenham funções imunes, tais como secreção de citocinas e expressão de moléculas MHC de classe I e II (EDDLESTON; MUCKE, 1993; MONTGOMERY, 1994; SOFRONIEW, 2010).

No SNC, a toxicidade do MTX parece afetar os astrócitos (GREGORIOS; SOUCY, 1990), sendo descritas tanto a degeneração astrocitária quanto a astrogliose reativa (GREGORIOS et al., 1989; GREGORIOS; SOUCY, 1990; BRUCE-GREGORIOS et al., 1991a,b). Além de causar ativação microglial, o MTX promove depleção das células precursoras de oligodendrócitos (OPCs), diferenciação aumentada e incompleta das OPCs e um persistente prejuízo na mielinização. Dessa forma, considera-se que o uso prolongado do MTX pode resultar em desregulação triglial persistente, por comprometer as três principais células gliais do SNC – os astrócitos, os oligodendrócitos e a micróglia (GIBSON et al., 2019).

Nesse contexto, o presente estudo visou investigar os efeitos do MTX administrado por curto intervalo de tempo (quatro dias) na morfologia do tecido nervoso, à microscopia de luz, em distintas áreas encefálicas (córtex frontal, hipotálamo, hipocampo e cerebelo), enfocando na resposta astrocitária, avaliada mediante análise morfométrica da expressão de GFAP, e na integridade das bainhas

de mielina, observadas pela técnica de coloração do *luxol fast blue*. Ainda, foram determinados os níveis encefálicos das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  para se determinar, se sob o esquema de administração empregado, prevaleceriam os efeitos antiinflamatórios e imunossupressores clássicos da droga ou se haveria possível indução de neuroinflamação a partir da agressão induzida.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Quimioterapia

Quimioterapia é o tratamento que utiliza substâncias químicas, isoladas ou combinadas, com o objetivo de tratar neoplasias malignas, entre tantas outras doenças. Sua atuação pode interferir no processo de crescimento e divisão celular, embora sem possuir especificidade de ação sobre as células tumorais (CALABRESI; CHABNER, 2002; AHLES et al., 2012; ROCHE, 2013).

A grande parte das drogas que são utilizadas na quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo no mecanismo de proliferação celular, tanto no DNA como no dos diferentes tipos de RNA (INCA 2018).

Os quimioterápicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em agentes alquilantes, os primeiros antineoplásicos descobertos; agentes platinantes, que inibem seletivamente a síntese de DNA; produtos naturais, como alcaloides da vinca, taxanos e antibióticos antitumorais, que interrompem o crescimento celular; hormônios, que bloqueiam o estrogênio e freiam a progressão do tumor; antimetabólicos, que bloqueiam quimicamente a síntese de DNA; anticorpos monoclonais, que reconhecem e se ligam a抗ígenos tumorais específicos, poupano as células hígidas (SINGH et al., 2018; ESPINOSA et al., 2003; TANAKA et al., 2009).

A classificação dos distintos agentes quimioterápicos, com seus principais representantes, pode ser vista no Quadro 1.

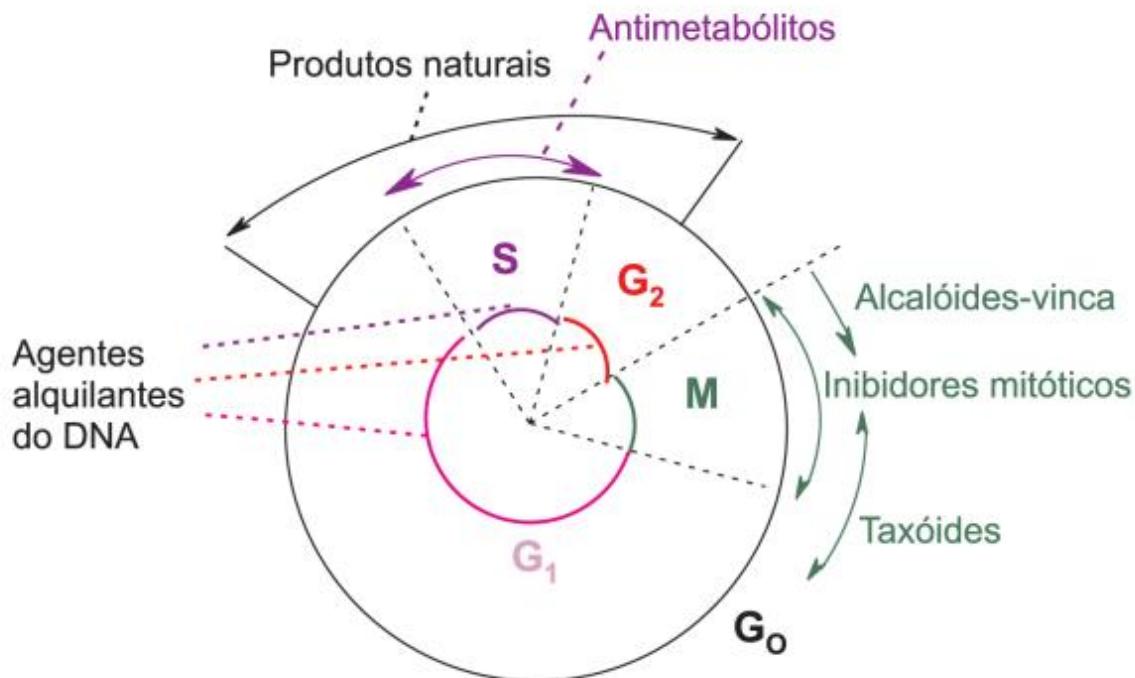
Quadro 1. Classificação e ação dos quimioterápicos.

Classe	Ação	Fármacos
Agentes alquilantes	Inibem a replicação celular.	Ciclofosfamida Clorambucil Melfalano Lomustine
Agentes platinantes	Inibem seletivamente a síntese de DNA.	Carboplatina Cisplatina
Antimetabólitos	Atuam na síntese de ácidos nucleicos e inibem reações enzimáticas.	Metotrexato 5- Fluorouracilo Mercaptopurina Gencitabina; fludarabina cladribina; pentostatina Citosina arabinosido (citarabina); azatioprina
Alcaloides da vinca e Taxanos	Impedem a divisão das células durante a metástase.	Vincristina; vinblastina Paclitaxel; docetaxel
Antibióticos antitumorais	Inibem a transcrição do DNA.	Doxorrubicina Mitomicina Bleomicina Actinomicina D Mitoxantrone
Hormônios	Atuam de forma ciclo-celular específica.	Prednisona Prednisolona
Anticorpos monoclonais recombinantes, radiomarcados, quimiomarcados, conjugados e bioespecíficos	Têm como alvo especificamente um determinado antígeno.	Brentuximabe Vedotin Ado-trastuzumabe amtansina

Fonte: Adaptado de Inca, 2018; Instituto Oncoguia, 2014.

A atuação de alguns quimioterápicos está diretamente ligada a uma das fases do ciclo celular. A Figura 1 exemplifica o ponto em que distintos quimioterápicos atuam no ciclo celular.

Fig. 1. Distribuição da ação dos quimioterápicos nas diversas fases do ciclo celular.



Fonte: ALMEIDA et al. (2005)

## 2.2 Metotrexato (MTX)

O MTX (ácido glutâmico 2,4-diamino-N10-dimetil) é um antimetabólito, antagonista do ácido fólico, com ação imunossupressora e antiproliferativa, que tem sido amplamente usado como tratamento em várias doenças neoplásicas e inflamatórias (SKUBISZ; TONG, 2012).

Foi desenvolvido na década de 40 por um grupo de pesquisadores dos Laboratórios Lederle (SKUBISZ; TONG, 2012), tendo recebido aprovação do U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) para ser usado em tratamento quimioterápico na década de 50 (KRISHAN, 2007). Até hoje tem sido amplamente usado no tratamento de leucemias, carcinomas, osteossarcomas, meningites neoplásicas, tumores cerebrais e de pescoço, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, meduloblastomas e tumores trofoblásticos (MAHONEY et al., 1998; OMURO et al., 2005; GALBIATTI et al., 2012; HALL et al., 2017). Em 1988, com a aprovação do FDA, passou também a ser empregado como agente antiinflamatório e imunossupressor em doenças autoimunes como artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, espondilite anquilosante, doença de

Crohn, dermatomiosite e na supressão de rejeição a transplantes (KIM et al., 2018; KEARNEY et al., 2019).

O MTX pode ser administrado por via oral, subcutânea, intramuscular, intravenosa e intratecal, apresentando tempo e eficiência de absorção relacionados à via de administração, tempo e dose administradas (SINGH; UDUPA, 1997; CALABRESI; CHABNER, 2002).

A meia-vida relatada para o metotrexato é de aproximadamente 3 a 10 horas para pacientes recebendo tratamento para doenças autoimunes com doses baixas (menos do que 30 mg/m<sup>2</sup>). Para pacientes recebendo altas doses (superior a 30 mg/m<sup>2</sup>) de metotrexato, a meia-vida é de 8 a 15 horas e é excretado pelos rins e tem como efeitos secundários nefotoxicidade, hepatotoxicidade, supressão da medula óssea, entre outros efeitos indesejáveis. Para superar tais efeitos da droga, uma alternativa é a de desenvolver um sistema de liberação diferenciado para o órgão-alvo diretamente (PEREIRA et al., 2014).

Quando o fármaco se encontra no seu estado de equilíbrio, ou seja, em concentração plasmática adequada, o MTX é distribuído rapidamente para os tecidos e pode acumular-se nos tecidos hepático e renal (SCHRODER; STEIN, 2003). A eliminação ocorre, principalmente, por via renal (aproximadamente 90%); os outros 10% são excretados pela secreção biliar e são eliminados juntamente com as fezes (MADDEN; EATON, 1995).

A associação de quimioterápicos, a via de administração e a dose administrada são importantes no desenvolvimento da toxicidade (VEZMAR, 2003; PASCUAL, 2008).

Acreditava-se que os quimioterápicos não atravessavam a barreira hematoencefálica (BHE), com exceção do MTX e do 5-fluorouracil. Hoje sabe-se que isso é apenas parcialmente verdadeiro, já que os quimioterápicos induzem a liberação de citocinas capazes de atravessar a BHE e, assim, atingir as células do tecido nervoso (WANG et al., 2015).

### **2.3 Mecanismo de ação do MTX**

Para entender o mecanismo de ação do MTX, é necessário entender a participação do ácido fólico (ácido pteroicglutâmico, vitamina B9) no processo de replicação celular e sua forma de absorção pelo organismo humano, já que o MTX é

classificado como antagonista do ácido fólico (ou folato) e pertencente à classe dos antimetabólitos (McGUIRE, 2003).

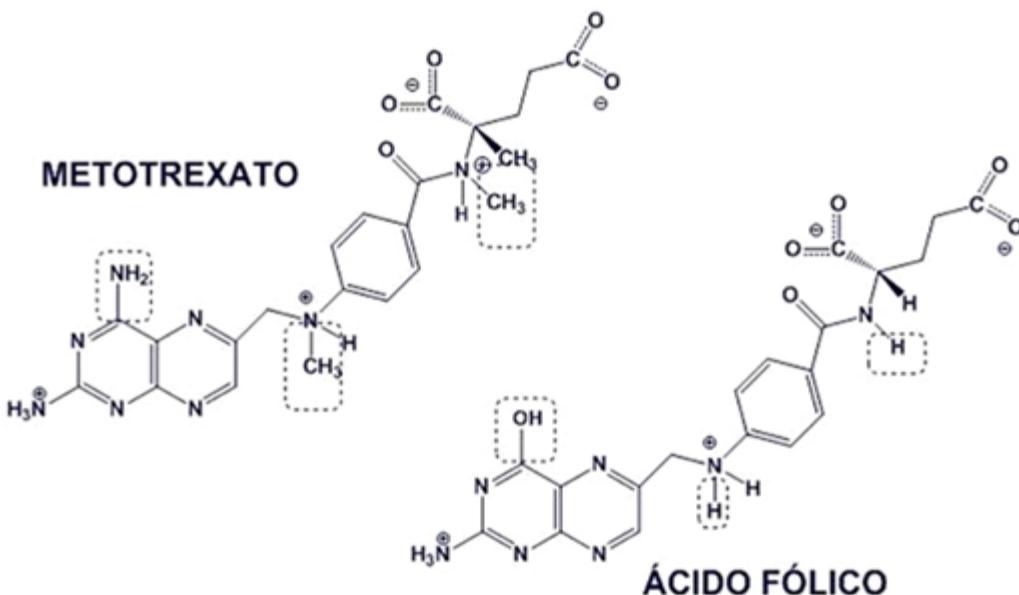
O ácido fólico pertence à família dos folatos e sua fonte é exclusivamente exógena. Em sua forma livre, é absorvido pelas células da mucosa intestinal do duodeno e jejuno onde sofre hidrólise, redução e metilação (OLSEN; DURHAM, 1991; NAGULU et. al., 2009; VANNUCCI; MONTEIRO, 2010). Torna-se biologicamente ativo pela ação da enzima di-hidrofolato-redutase (DHFR), que faz a biossíntese de tetra-hidrofolato (L-5 metil tetra-hidrofolato de cálcio - 5-MTHF) a partir de di-hidrofolato (McGUIRE, 2003; VANNUCCI; MONTEIRO, 2010). Nesta forma ativa é transportado para o fígado e outros órgãos por meio de proteínas plasmáticas, principalmente albumina. No fígado, é armazenado na forma de poliglutamato.

O ácido fólico é indispensável no ciclo celular, sobretudo na fase S, durante a qual ocorre atividade de síntese de DNA e de algumas proteínas (OLSEN; DURHAM, 1991; NAGULU et al., 2009). O tetra-hidrofolato participaativamente como uma coenzima no metabolismo dos aminoácidos, na formação dos ácidos nucleicos, na eritropoiese, na conversão da serina em glicina e na metilação da homocisteína (Hcy), transformando-a em metionina e formando o nucleotídeo timidilato (OLSEN; DURHAM, 1991; McGUIRE, 2003; NAGULU et al., 2009; VANNUCCI; MONTEIRO, 2010).

O MTX, ao diminuir a expressão da enzima DHFR, causa a depleção intracelular de tetra-hidrofolato e aumenta o acúmulo de di-hidrofolato; em consequência, há uma inibição das reações de transferência de unidades de carbono (McGUIRE, 2003; ABOLMAALI; TAMADDON; DINARVAND, 2013). Essa reação interrompe a síntese de timidina, purinas e aminoácidos, afetando de forma negativa a síntese de DNA e RNA e a divisão celular (CHAN; CRONSTEIN, 2002; SCHRODER; STEIN, 2003; VEZMAR et al., 2003).

Conforme demonstrado na Figura 2, o ácido fólico e o MTX são compostos estruturalmente semelhantes, diferindo apenas na substituição de um grupo amino por um grupo hidroxila e na adição de um grupo metila entre os grupos pteroíla e benzoíla. Essa afinidade maior pela enzima DHFR que os folatos naturais, é capaz de inibir competitivamente e resultar em depleção dos cofatores de tetra-hidrofolato (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

Fig. 2. Estrutura química do MTX e do ácido fólico



Fonte:[http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g9\\_methotrexato/semelhancas.html](http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g9_methotrexato/semelhancas.html)

O MTX atua também sobre a síntese de purinas, aumentando a adenosina intracelular. O aumento dos níveis endógenos de adenosina está relacionado com a inibição da enzima 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase (ATIC). A inibição desta enzima (ATIC) promove o acúmulo de 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR), que inibe a adenosina desaminase e a adenosina monofosfato desaminase, necessárias para a conversão de adenosina em inosina. Esse aumento intracelular de AICAR faz com que o composto seja transportado para o meio extracelular e ativa receptores próprios e de células vizinhas, gerando aumento da concentração de AMP cíclico intracelular. Tal processo reduz a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12 (HIDER; BRUCE; THOMSON, 2007; ERNST; GARRISON; THOMPSON, 2010).

O MTX promove o aumento de homocisteína através da inibição do THF que afeta de forma negativa a remetilação da homocisteína, esse aumento resulta em aminoácidos sulfurados, estruturalmente semelhantes ao aspartato e glutamato, os quais apresentam efeitos excitatórios (VEZMAR et al., 2003), além de interferir ainda sobre a síntese de biopterinas, impedindo a formação de tetrabiopterinas,

imprescindíveis para a hidroxilação de tirosina, fenilalanina e triptofano, que, posteriormente, dão origem aos neurotransmissores dopamina e serotonina (VEZMAR et al., 2003).

A despeito da evolução atualmente apresentada no tratamento do câncer, ainda assim os efeitos colaterais da quimioterapia são extremamente danosos para as demais células hígidas, uma vez que ela não atinge somente as células tumorais. Uma série de efeitos adversos vem se sobressaindo nos últimos tempos, entre eles as disfunções cognitivas também denominadas *chemobrain* (SEZER; USTA; CICIN, 2008; AHLES et al., 2012; GALBIATTI et al., 2012; MAYO et al., 2016).

## 2.4 *Chemobrain* e neurotoxicidade

*Chemobrain* é um termo utilizado para definir a disfunção cognitiva causada pela toxicidade da quimioterapia. Grande parte dos médicos a define como uma perda da nitidez mental já que as funções cognitivas são as responsáveis por definir nossa percepção, fazer representações mentais daquilo que nos rodeia, apreender, processar, guardar e transmitir informação, criar, tomar decisões, ter consciência do que somos, falar e ensinar. Fazem parte das funções cognitivas: a linguagem, a memória, a orientação, a atenção e a concentração (KAM et al., 2015).

Com a debilitação da cognição, o paciente torna-se incapaz de exercer afazeres rotineiros, sofre com lapsos de memória, apresenta dificuldade em executar tarefas simples, apresenta problemas de concentração, tem pensamento lento e não consegue adquirir novas habilidades (AHLES; SYKIN, 2007).

A incidência de alterações cognitivas relacionadas com a quimioterapia varia de 16% a 75% (JANSEN et al., 2010; ARGYRIOU et al., 2011).

Foi constatado que os quimioterápicos estão associados com o aumento da morte celular e com a diminuição da divisão celular sendo que, essa neurotoxicidade na zona subventricular do hipocampo, afeta o desempenho das funções cognitivas (RAFFA, 2011).

As consequências do uso prolongado do MTX consistem em lesões necrotizantes bilaterais, astrogliose reativa, desmielinização, trombose dos vasos sanguíneos e também degeneração das substâncias branca e cinzenta do tecido nervoso (GREGORIOS et al., 1989; KISHI et al., 2003; LINNEBANK et al., 2005).

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 visuoespacial, diminuição da capacidade de concentração e disfunção motora (van DAM et al., 1998; SCHAGEN et al., 1999; WEFEL et al., 2004; JENSEN et al., 2005; RAFFA et al., 2006; BOYKOFF; MOIENI; SUBRAMANIAN, 2009; MYERS, 2009; WEIS; POPPELREUTER; BARTSCH, 2009; JANSEN et al., 2010; CORREA, 2010; ELBELTAGY et al., 2010; RAFFA, TALLARIDA, 2010; WEFEL et al., 2010).

Tais disfunções cognitivas têm grande impacto na qualidade de vida dos doentes, interferindo em seu cotidiano (BOYKROFF; MOIENI; SUBRAMANIAN, 2009; VARDY, DHILLON, 2010) e no seu grau de independência (MUNIR et al., 2010).

No SNC, a toxicidade do MTX parece afetar primeiramente os astrócitos (GREGORIOS et al., 1991).

## 2.5 Astrócitos

O SNC é composto pelas células neuronais e gliais. As últimas, por sua vez, são divididas em micróglia e macróglia, que é composta por três outros tipos celulares - os oligodendrócitos, os astrócitos e as células ependimárias (VOLTERRA; MELDOLESI, 2005; STIPURSKY et al., 2010, 2011, 2012).

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC e constituem aproximadamente metade das células do encéfalo. Apresentam morfologia estrelada, o que dá origem ao seu nome, derivado das palavras gregas *astron* (estrela) e *cyte* (célula). Possuem prolongamentos com filamentos intermediários (fibrilas gliais) dotados da proteína glial fibrilar ácida (GFAP - *glial fibrillary acidic protein*); da proteína ligadora de cálcio (S-100  $\beta$ ); das enzimas glutamina sintetase (conversora de glutamato em glutamina) e aldeído desidrogenase 1, família L1 (ALDH1L1), dentre outros constituintes (CAHOY et al., 2008; KIMELBERG; NEDERGAARD, 2010; VASILE et al., 2017).

Classificam-se os astrócitos em protoplasmáticos ou fibrosos, de acordo com o comprimento e a quantidade de seus prolongamentos. Os astrócitos protoplasmáticos são encontrados na substância cinzenta e os fibrosos, na substância cinzenta, sendo considerados uma reserva energética do SNC em razão da grande presença de grânulos de glicogênio em seu citoplasma (PEREA; ARAQUE, 2005).

Desempenham diversas funções que são essenciais no SNC, como apoiar neurônios mediante secreção de fatores neurotróficos, essenciais para a sobrevivência e a diferenciação dos mesmos; regular as concentrações iônicas no microambiente neural; participar da transmissão sináptica e remover neurotransmissores, como glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA); participar na formação da BHE; auxiliar na regulação do fluxo sanguíneo encefálico; auxiliar na resposta imunológica do SNC pela secreção de citocinas e expressão de moléculas MHC de classe I e II; orientar a migração neuronal durante o desenvolvimento do tecido nervoso; formar a cicatriz glial após lesão nervosa (NEDERGAARD et al., 2003; DE KEYSER et al., 2008; KREBS; WEINBERG; AKESSON, 2014).

Qualquer alteração nas funções dos astrócitos pode conduzir a um prejuízo da atividade neuronal ou mesmo a danos neuronais, uma vez que os astrócitos têm uma função suplementar para os neurônios e desempenham um papel importante na captação e metabolismo dos neurotransmissores (VEZMAR et al., 2003). Não se sabe ao certo por qual mecanismo de ação o MTX induz a neurotoxicidade, acreditando-se ser um processo multifatorial (QUINN et al., 1997; NIGRO et al., 2000; VEZMAR et al., 2003). Uma possível causa seria pelo aumento das concentrações de homocisteína, frente à diminuição da expressão da DHFR e consequentemente diminuição do THF no SNC (KOLLING et al., 2010; LOUREIRO et al., 2010; ABOLMAALI; TAMADDON; DINARVAND, 2013).

A homocisteína é um aminoácido formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina proveniente da dieta. (FONSECA et al., 1999). O nível de homocisteína no corpo é regulado pelo processo de remetilação, que consiste na conversão da substância novamente em metionina, reação essa que requer presença ácido fólico e vitamina B12, ou por meio da transulfuração, que a transforma em cisteína (KOLLING et al., 2010; LOUREIRO et al., 2010).

A elevação da homocisteína, além de surgir em situação de diminuição de concentração sérica de ácido fólico, vitamina B12, vitamina B6 ou grupo metil, pode também ocorrer em situações de hipotireoidismo, doença renal, psoríase ou como efeito lateral de alguns medicamentos (QUINN et al., 1997; DRACHTMAN et al., 2002; VEZMAR et al., 2003).

A hiper-homocisteinemia é considerada fator de risco para doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, trombose e infarto, e neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer e a Doença de Parkinson. Já a hipermetioninemia, pode ocasionar desordens neurológicas, déficits cognitivos e edema cerebral (SCHERER et al., 2014).

A homocisteína é tóxica para o endotélio vascular, promovendo o processo de trombogênese e, assim, podendo ser a responsável pela microangiopatia mineralizante e pela isquemia da substância branca observadas em pacientes neurointoxicados pelo MTX (DRACHTMAN et al., 2002; KISHI et al., 2003). Além disso, a homocisteína libera aminoácidos sulfurados estruturalmente semelhantes ao glutamato e aspartato induzindo excitotoxicidade. Juntos, esses eventos poderiam justificar a patogênese da neurotoxicidade e das convulsões descritas para o MTX (QUINN et al., 1997; DRACHTMAN et al., 2002; VEZMAR et al., 2003).

É descrito que o MTX se mostra capaz de induzir astrogliose reativa, assim como a degeneração desse tipo celular (GREGORIOS; SOUCY, 1990; BRUCE-GREGORIOS et al., 1991a,b).

Dentre as principais reações astrocitárias destacam-se a astrocitose (hiperplasia), caracterizada pelo aumento do número de astrócitos, e a astrogliose (hipertrofia), caracterizada pelo aumento de suas dimensões, além de diversas outras alterações funcionais, como espessamento dos feixes de filamentos gliais e consequente aumento da intensidade da expressão de GFAP (EDDLESTON; MUCKE, 1993; MONTGOMERY, 1994; SOFRONIEW, 2010).

Os fenômenos astrocitários são referidos na literatura como gliose astrocitária, astrocitose ou astrogliose reativa, cicatriz glial ou simplesmente gliose, sendo classificados em dois tipos de acordo com o tipo da lesão – isomórfica, a qual tem seus elementos teciduais orientando os processos astrocitários, preservando o arranjo dos feixes de filamentos gliais de forma uniforme e paralela; e anisomórfica, na qual sua disposição é irregular ao redor de lesão geralmente causadora de dano

morfológico grave no tecido, com ruptura da BHE (BIGNAMI; DAHL, 1994; FERNAUD-ESPINOSA et al., 1993).

## 2.6 Citocinas

As citocinas atuam como mediadoras na comunicação celular especialmente na resposta imune. Sua produção é ativada mediante à inflamação, infecção e lesão tecidual. Incluso no termo citocina encontramos interleucinas, quimiocinas, interferons, fatores de crescimento e fatores de necrose tumoral (ALLAN; ROTHWELL, 2001; KADHIM et al., 2008).

No SNC, é difícil determinar a origem exata das citocinas pró-inflamatórias pela variação da população celular constituinte. Mas já se sabe que astrócitos, micróglia e células endoteliais são os principais produtores de citocinas (HANISCH, 2002). Outra possível fonte de citocinas são as células ependimárias e o plexo coroide que podem expressar IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Ainda, os próprios leucócitos que adentram o SNC podem contribuir para a produção de citocinas (KIM et al., 2004; MARQUES et al., 2007).

A IL-1 tem ação semelhante ao TNF e a IL-6, atua na coestimulação de linfócitos T e na indução de produção de citocinas por monócitos/macrófagos. É uma potente ativadora de células endoteliais, promovendo a expressão de moléculas de adesão, além de induzir a produção de agentes vasodilatadores. No SNC é considerada o principal pirógeno endógeno, e atua também no sistema neuroendócrino hipotálamo hipófise-adrenal, promovendo a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) (ROTHWELL; LUHESHI, 2000).

As principais produtoras dessa citocina são as células da linhagem monocítica-macrofágica, entretanto, na presença de estímulos, uma grande variedade de tipos celulares é capaz de produzi-la (MANTOVANI, 2003; ROTHWELL; LUHESHI, 2000).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina multifuncional que tem atividade durante a inflamação aguda e crônica, com quimiotaxia de leucócitos em processos inflamatórios e infeciosos e induz apoptose. É produzido principalmente por macrófagos e é importante no combate à patógenos, como alguns vírus, bactérias Gram-positivas, micobactérias e protozoários. É uma citocina tipicamente pró-inflamatória, por promover ativação de neutrófilos, efeito pró-coagulante no endotélio, produção de

espécies reativas de oxigênio e estimulação da síntese de enzimas proteolíticas (BEUTLER, 2003; POPA et al., 2007).

O MTX tem efeito inibitório da produção de citocinas pró-inflamatórias interferindo na ligação da IL-1 $\beta$  ao seu receptor e gerando um tipo menos inflamatório de monócito circulante (BRODY et al., 1993; SEITZ et al., 1996; LI et al., 2011).

Estudos *in vitro* propõem que o MTX tem capacidade de manter e aumentar os níveis de adenosina extracelular promovendo o acúmulo de AICAR (ribonucleotídeo aminoimidazocarboxamida) que participa da biossíntese de novo de purinas. A desfosforilação do AICAR gera um metabólito que inibe a adenosina desaminase (ADA), que converte adenosina em inosina, promovendo o acúmulo de adenosina no citoplasma. Essa adenosina é transportada para o meio extracelular por receptores purinérgicos de tipo 2 expressos na membrana de leucócitos, promovendo elevados níveis de adenosina extracelular e levando ao aumento da concentração de AMP cíclico que reduz a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-12 (HIDER; BRUCE; THOMSON, 2007; ERNST; GARRISON; THOMPSON, 2010).

### 3 OBJETIVOS

Foram objetivos do presente estudo:

- investigar as possíveis alterações morfológicas causadas pelo MTX no tecido nervoso, mediante observação de cortes histológicos de diferentes áreas encefálicas de ratos (córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e cerebelo) corados com hematoxilina-eosina e *luxol fast blue* (para detecção de áreas de desmielinização), assim como em cortes marcados para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), principal marcador da população astrocitária e indicador de injúria nervosa;
- determinar as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no encéfalo de ratos após administração de curto prazo de MTX.

#### 4 JUSTIFICATIVA

Estudos realizados em animais de laboratório oferecem a possibilidade de avaliar o comprometimento morfológico e funcional induzido pela quimioterapia, evitando, assim, possíveis transtornos em pacientes humanos. Atualmente, ainda não há qualquer tratamento efetivo para os efeitos colaterais neurotóxicos desses agentes quimioterápicos, dentre eles, o MTX. Dessa forma, busca-se uma melhor compreensão das causas da neurotoxicidade dos mesmos durante e após a quimioterapia, a fim de prevenir ou tratar os efeitos do *chemobrain*.

O estudo dos efeitos deletérios à cognição de pacientes tratados com quimioterápicos tem sido amplamente pesquisado em diversos países, porém ainda restam muitas lacunas a serem preenchidas sobre os mecanismos de ação das drogas utilizadas e seus possíveis efeitos nocivos sobre as células constituintes do tecido nervoso. Cabe à pesquisa básica aprofundar os conhecimentos celulares a fim de colaborar para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas que permitam reduzir os efeitos adversos dos quimioterápicos.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento experimental

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Cruzeiro do Sul, sob protocolo 017-2017 (anexo).

Foram utilizados 30 ratos Wistar, machos, de 4 a 6 meses de idade, sendo distribuídos em 3 grupos experimentais, a saber:

**Grupo CTR (controle)** - Ratos injetados com solução salina 0,9% por via intraperitoneal (IP) (n=10);

**Grupo MTX5** - Ratos injetados com MTX (5 mg/kg/dia por 4 dias consecutivos, via IP, n=10);

**Grupo MTX10** - Ratos injetados com MTX (10 mg/kg/dia por 4 dias consecutivos, via IP, n=10).

Os animais pertencentes aos grupos MTX foram injetados com MTX (Metrexato®), por via intraperitoneal, nas doses de 5 ou 10 mg/kg/dia durante 4 dias consecutivos e os animais pertencentes ao grupo controle foram injetados com o mesmo volume de solução salina estéril 0,9% IP. Três dias após a 4<sup>a</sup> aplicação de MTX ou de solução salina, os animais foram eutanasiados e metade de cada grupo (n=5) com solução de tiopental (60 mg/kg, via IP) e submetidos à perfusão intracardíaca com formol tamponado a 10% e outra metade de cada grupo (n=5) por guilhotina. Tiveram seus encéfalos coletados, permanecendo por um período de 72 horas na referida solução fixadora e, após, sendo realizados cortes coronais para obtenção das seguintes regiões encefálicas - córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e cerebelo.

As amostras permaneceram por, no máximo, 48 horas na solução fixadora para posterior desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes transversais de 5 µm foram obtidos, montados em lâminas histológicas e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (H-E), sendo observados e fotografados em fotomicroscópio. Cortes histológicos foram também confeccionados para coloração pela técnica de *luxol fast blue* (para observação das bainhas de mielina) e para marcação imuno-histoquímica da GFAP (para análise da população astrocitária).

## 5.2 Coloração hematoxilina-eosina (H-E)

Para a realização da técnica histológica de coloração com H-E, as lâminas passaram por um processo de desparafinização composto por duas etapas em xanol, sendo a primeira na estufa a 60°C por 30 minutos e a segunda à temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, foi realizado o processo de hidratação com passagens das lâminas em concentrações decrescentes de álcoois e finalização com água corrente por 1 minuto. Após a fase de hidratação alcoólica, as lâminas foram coradas com hematoxilina por 50 segundos, voltando para água corrente por 2 a 4 minutos, garantindo a oxidação da hematoxilina. Já a coloração pela eosina foi feita no tempo de 20 segundos, sendo precedida pela passagem em álcool absoluto. Após o término da coloração, a desidratação do material seguiu com 3 passagens em álcool absoluto. A clarificação das lâminas foi realizada pela passagem em xanol, que, se seguiu com uma segunda passagem no mesmo, de forma que a lâmina ficava pronta para a montagem, com resina sintética (Entellan®, Merck) e lamínula sobre o corte.

## 5.3 Técnica de *luxol fast blue*

Na técnica de *luxol fast blue*, as lâminas sofreram desparafinização e foram hidratadas até álcool 95%, sendo, em seguida colocadas no corante *luxol fast blue* a 0,1% na estufa a 60°C, por 24 horas. Posteriormente, para a retirada do excesso do corante, as lâminas foram passadas em álcool 95% e, assim, preparadas para a diferenciação que foi realizada com carbonato de lítio a 0,05% por 20 segundos, seguindo para uma passagem em álcool 70%. A contracoloração foi realizada com cresil violeta por 6 minutos e, posteriormente, as lâminas foram desidratadas, clarificadas e montadas com meio de montagem sintético (Entellan®, Merck).

## 5.4 Marcação imuno-histoquímica para GFAP

A marcação imuno-histoquímica para a GFAP foi realizada utilizando o método conjugado a uma cadeia de polímeros (*chain polymer-conjugated staining method*) (DAKO EnVision System). Foi utilizada imunoglobulina anti-GFAP policlonal de coelho (1:1000; Z033401, Dako, Glostrup, Dinamarca) como anticorpo primário,

seguida pelo kit EnVision (EnVision+ Kit, HRP/Rabbit/DAB+, K4011, Dako, Glostrup, Dinamarca). Dez fotomicrografias de cada lâmina analisada foram feitas com o uso de objetiva de 40x. A área de astrócitos e seus processos marcados em marrom, foi calculada automaticamente, 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 foram incluídas e a coloração de fundo foi excluída da medição. O index astrocitário *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.

### **5.5 Determinação de níveis encefálicos de citocinas**

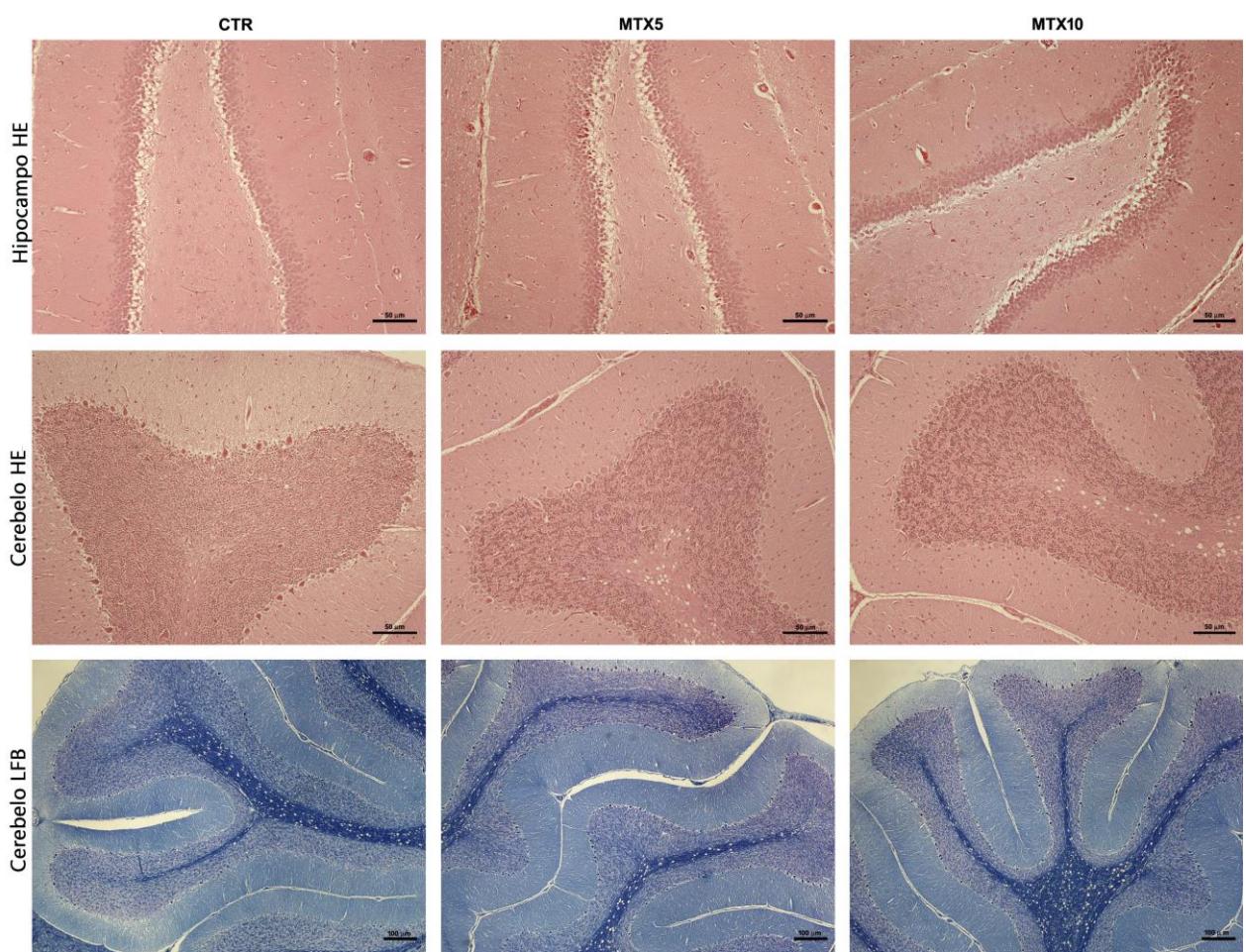
O procedimento para obtenção do homogenato encefálico foi adaptado do protocolo descrito por Yen et al. (1999). Após descongelamento, os encéfalos foram adicionados a tubos Falcon® de 50mL contendo 1 mL de PBS (pH 7,4) e então submetidos a 20 passagens sucessivas (15 segundos cada) pelo homogeneizador de tecido Wheaton®. Posteriormente, o material obtido foi centrifugado a 12.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido à nova etapa de centrifugação nas mesmas condições. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -80°C para posteriores análises dos níveis das citocinas utilizadas no estudo. A concentração total de proteínas de cada homogenato foi avaliada por meio do método de Bradford (1976).

Os níveis encefálicos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram determinados em duplicata por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções dos fabricantes: kit de ELISA IL-1 $\beta$  Platinum de rato (eBioscience, BMS630, San Diego, Califórnia, EUA) e kit de ELISA TNF- $\alpha$  Platinum de rato (eBioscience, BMS622, San Diego, Califórnia, EUA).

## 6 RESULTADOS

Não foram encontrados sinais de perda ou degeneração neuronal à microscopia de luz nas lâminas, bem como não foram observados indícios de perda ou desestruturação das bainhas de mielina em todas áreas analisadas deste estudo (córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e camadas granular e molecular do cerebelo) (Figura 3).

Fig. 3 - Fotomicrografias dos cortes corados pelas técnicas de HE e *luxol fast blue* para os distintos grupos (grupos controle / CTR - solução salina 0,9%, IP; MTX5 - 5 mg/kg/dia, por 4 dias, IP; MTX10 - 10 mg/kg/dia, por 4 dias, IP). Hipocampo e cerebelo (camadas molecular e granular). Barra = 50 micrômetros.



Na análise das lâminas observou-se aumento da expressão astrocitária de GFAP em todas as áreas do encéfalo (côrte frontal, hipocampo, hipotálamo, camadas granular e molecular do cerebelo) nos grupos tratados com MTX em comparação com o grupo controle (Figura 4). Este aumento foi maior no grupo MTX10 em comparação ao MTX5. Fotomicrografias da marcação imuno-histoquímica para a GFAP nas diferentes áreas e grupos são apresentadas na Figura 5.

Fig. 4 - Expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em ratos tratados com metotrexato (grupos controle / CTR - solução salina 0,9%, IP; MTX5 - 5 mg/kg/dia, por 4 dias, IP; MTX10 - 10 mg/kg/dia, por 4 dias, IP). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. \*\* p <0,01; \*\*\* <0,001; \*\*\*\* p <0,0001 (one way – ANOVA)

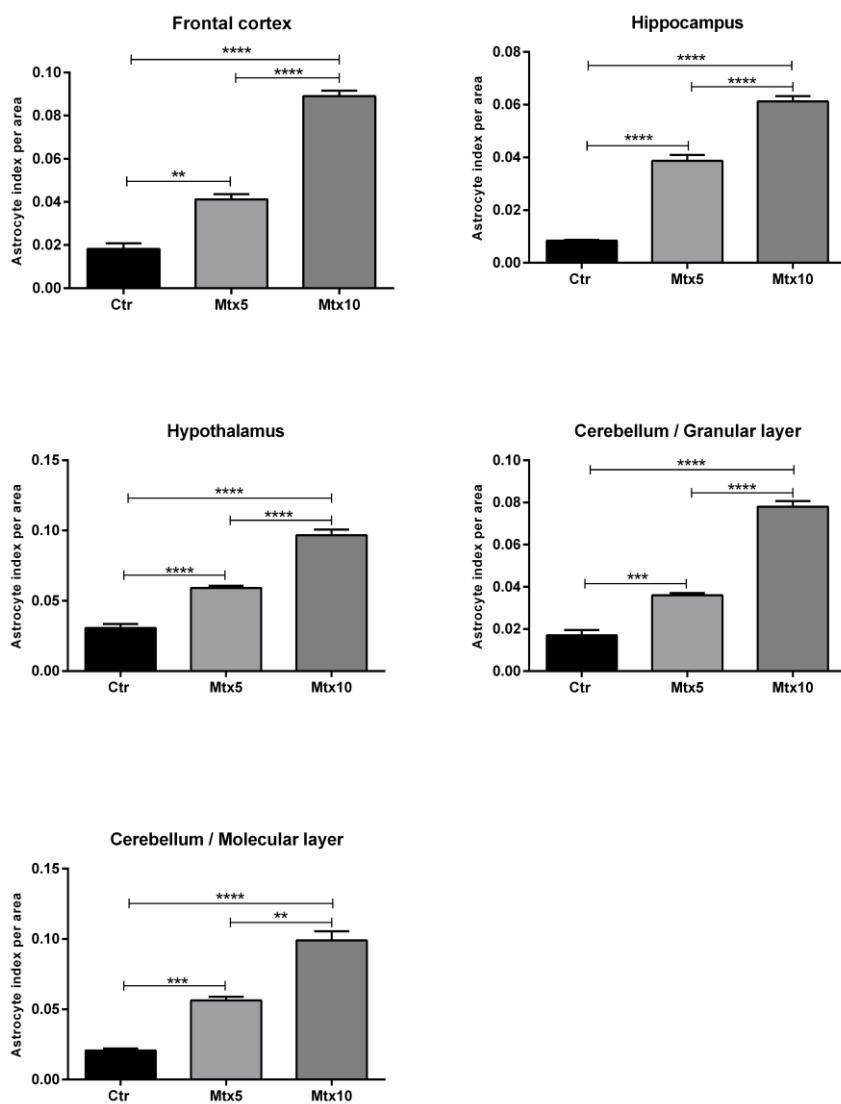
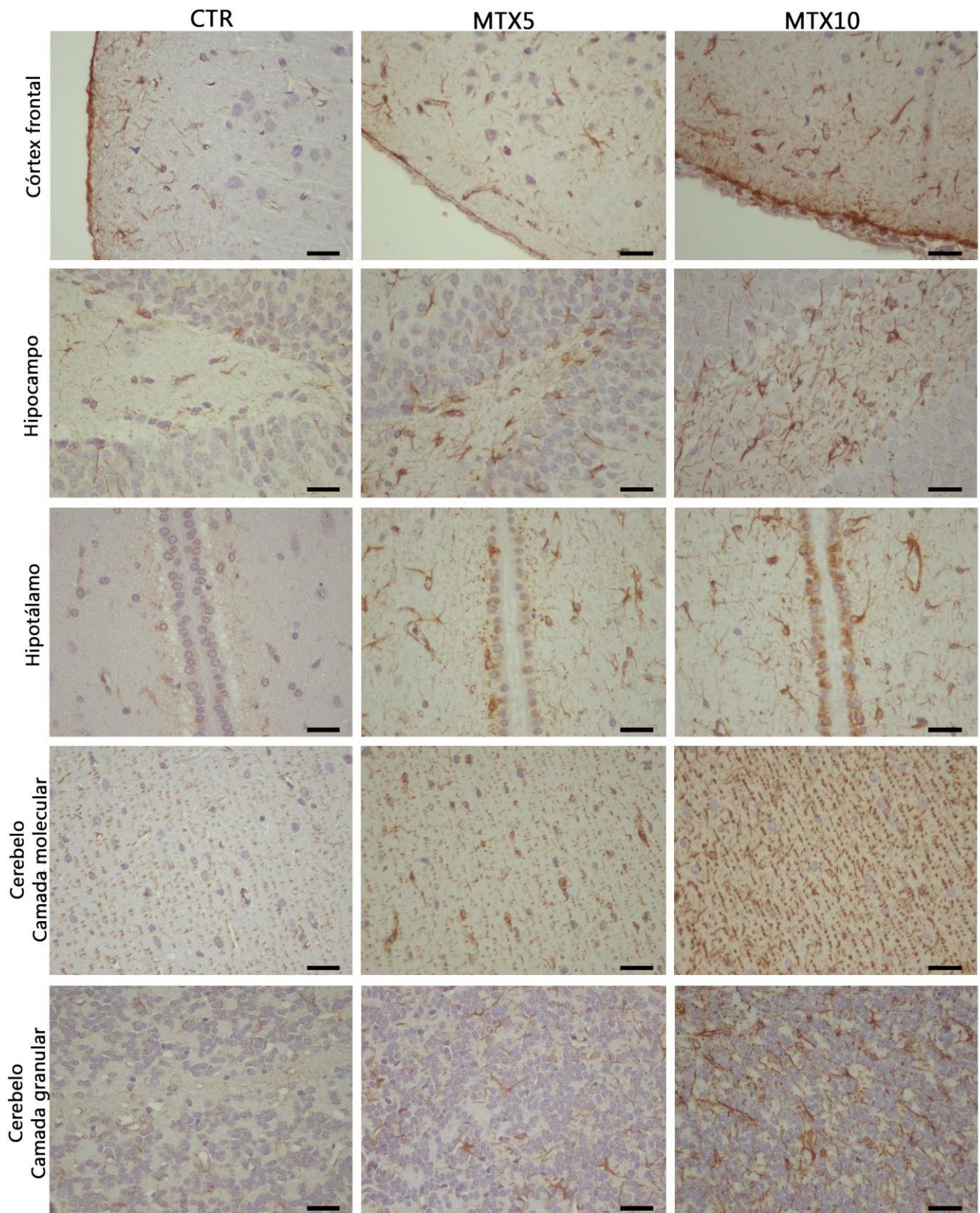
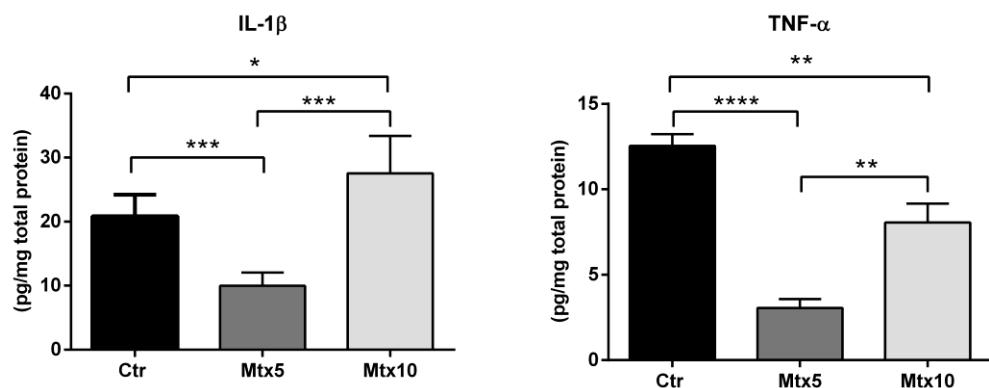


Fig. 5 - Fotomicrografias das lâminas submetidas a marcação imuno-histoquímica para a GFAP para os distintos grupos (grupos controle / CTR - solução salina 0,9%, IP; MTX5 - 5 mg/kg/dia, por 4 dias, IP; MTX10 - 10 mg/kg/dia, por 4 dias, IP) no córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e camadas molecular e granular do cerebelo. Barra = 50 micrômetros.



Os níveis encefálicos das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são apresentados na Figura 6. Ambas citocinas diminuíram no grupo MTX5 em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$  para IL-1 $\beta$  e  $p < 0,0001$  para TNF- $\alpha$ ). No grupo MTX10, o TNF- $\alpha$  igualmente diminuiu ( $p < 0,0001$ ), embora a IL-1 $\beta$  tenha aumentado em comparação aos controles ( $p < 0,01$ ).

Fig. 6 - Níveis encefálicos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (em pg / mg de proteína total). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  (One way - ANOVA).



Nesse contexto, constata-se que a administração do MTX induziu a astrogliose em várias áreas do encéfalo, porém, no grupo MTX5, aparentemente ocorreu na presença de citocinas pró-inflamatórias diminuídas.

## 7 DISCUSSÃO

De forma resumida, este estudo revelou que os animais que receberam MTX na dose de 5 e 10 mg/kg/dia, por via IP, durante o curto intervalo de 4 dias, exibiram um aumento da expressão astrocitária de GFAP em todas as áreas analisadas (côrTEX frontal, hipocampo, hipotálamo e camadas granular e molecular do cerebelo). Foi visto também que o MTX foi capaz de diminuir os níveis encefálicos das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  quando administrado na dose de 5 mg/kg/dia. Quando utilizado na dose de 10 mg/kg/dia, verificou-se ainda redução do TNF- $\alpha$  no tecido encefálico, no entanto, já com um aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  em comparação ao grupo controle. Comparando-se os dois grupos tratados com diferentes doses de MTX, percebe-se que o grupo MTX10 apresentou aumento das concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em comparação ao MTX5, sugerindo que a maior dose, em vez de potencializar os efeitos antiinflamatórios clássicos descritos para a droga (CRONSTEIN; NAIME; OSTAD, 1993; CHAN; CRONSTEIN, 2001), já começava a representar uma agressão tecidual capaz de suplantar sua ação supressora sobre as citocinas pró-inflamatórias, inclusive com níveis maiores de IL-1 $\beta$  em relação aos animais do grupo controle.

A quimioterapia aplicada no tratamento do câncer resulta em uma síndrome frequente, porém ainda pouco compreendida, que corresponde a déficits neurológicos em longo prazo. Pensa-se que a disfunção das células precursoras neurais e a disfunção da substância branca contribuam para essa síndrome debilitante (GIBSON et al., 2019).

O MTX é um inibidor da di-hidrofolato redutase amplamente empregado no tratamento de crianças com leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfomas não-Hodgkin e osteossarcomas (JACOLA et al., 2016; JING et al., 2018). Os regimes curativos para pacientes com essas condições geralmente incluem tanto a administração sistêmica (oral e/ou intravenosa), bem como doses intratecais repetidas, a fim de transpor a BHE e proteger o SNC de recidivas (LI et al., 2010).

A fisiopatologia da neurotoxicidade induzida pelo MTX é multifatorial e ainda pouco definida (VEZMAR et al., 2003; COLE; KAMEN, 2006). Modelos experimentais animais contribuem para elucidar os mecanismos subjacentes à disfunção cognitiva após a administração sistêmica e intratecal de MTX (SEIGERS et al., 2009; LI et al., 2010; THOMSEN et al., 2017). Os resultados de tais modelos

sugerem que o MTX pode induzir déficits cognitivos por indução de estresse oxidativo (CARON et al., 2009), por modulação do sistema imunológico (CUTOLO et al., 2001; PHILIPS et al., 2003; ZHANG et al., 2009), por inibição da neurogênese (SEIGERS et al., 2009), por alteração da neurotransmissão por meio do receptor NMDA (VIJAYANATHAN et al., 2011; COLE et al., 2013) e/ou por indução de alterações estruturais no cérebro (SEIGERS et al., 2009). Outros estudos apontam para o receptor alfa-7 nicotínico de acetilcolina, uma vez que moduladores positivos deste receptor, como a cotinina, melhoraram a memória espacial e diminuíram o comportamento depressivo em ratos tratados com MTX, ciclofosfamida e 5-flurouracil (IARKOV et al., 2016).

Os astrócitos desempenham papel importante na função de regulação da BHE, a qual confere ação protetora crucial diante da possibilidade de neurotoxicidade de um determinado agente (ABBOTT, 2006; ALVAREZ et al., 2017). Adicionalmente, o astrócito exerce funções importantes para a formação e manutenção de sinapses, para a captação de glutamato e no suporte trófico para neurônios e demais células da glia circundantes (BELANGER; MAGISTRETTI, 2009; FILOUS; SILVER, 2016). Dessa forma, alterações estruturais e/ou funcionais astrocitárias acabam por contribuir para a fisiopatologia de uma grande variedade de estados patológicos do SNC, de doenças neurodegenerativas a gliomas (PHATNANI; MANIATIS, 2015).

Um recente estudo *in vitro* demonstrou que o MTX foi capaz de induzir citotoxicidade severa em linhagens celulares de astrócitos C6 (provenientes de gliomas) e culturas primárias de astrócitos de ratos de maneira dose-dependente. Além disso, numa abordagem *in vivo*, este mesmo estudo revelou que as células marcadas com GFAP diminuíram significativamente na medula espinhal e no encéfalo dos ratos, com indicativos de ocorrência de apoptose, fornecendo evidências adicionais quanto ao efeito neurotóxico do MTX sobre o SNC, especialmente sobre astrócitos (SHAO et al., 2019).

Culturas primárias de astrócitos preparadas a partir de ratos Sprague-Dawley de 2-3 dias apresentaram diminuição da taxa mitótica e da viabilidade celular com a introdução de MTX, ocasionando mudanças reativas em algumas células (GREGORIOS; SOUCY, 1990; BRUCE-GREGORIOS et al., 1991a) e aumento da expressão de GFAP, que não estava correlacionada com a dosagem da droga ou

com a síntese de DNA (BRUCE-GREGORIOS et al., 1991b). Os autores postularam que o aumento encontrado refletiria uma resposta astrocitária adaptativa frente à injúria induzida pelo MTX e parcialmente explicaria a gliose observada na encefalopatia do MTX.

Nossos resultados confirmam *in vivo* o aumento da expressão astrocitária de GFAP frente ao MTX, no entanto, sugerem ter havido efeito dose-dependente, uma vez que a astrogliose encontrada no grupo MTX10 foi significativamente maior em relação ao grupo MTX5.

É reconhecido que o início e o controle da astrogliose podem ser induzidos por várias moléculas de sinalização secretadas pelas células da glia, neurônios, pericitos, células endoteliais e células inflamatórias invasivas (SOFRONIEW, 2009, 2015; SOFRONIEW E VINTERS, 2010). Esses sinais moleculares incluem: (i) fatores de crescimento e citocinas (por exemplo, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ); (ii) mediadores da imunidade inata (por exemplo, LPS); (iii) neurotransmissores (por exemplo, glutamato e noradrenalina); (iv) purinas (por exemplo, ATP); (v) espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (NRS); e (vi) produtos associados à atividade metabólica sistêmica (por exemplo, NH4 $+$ ), dentre outros (SOFRONIEW, 2009, 2010).

Um estudo recente demonstrou que o MTX pode induzir a depleção persistente das células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) e déficits persistentes na mielinização em camundongos. Os autores sugeriram que o MTX pode levar a uma ativação persistente da micróglia, a qual bloquearia a proliferação das OPCs e sua completa diferenciação, com subsequente formação de bainhas de mielina mais finas. Além disso, a micróglia ativada promoveria a ativação astrocitária, com aparecimento de astrócitos reativos que poderiam induzir a morte oligodendroglial e danos neuronais. Uma vez retirada de seu estado de quiescência, a micróglia pode iniciar a fagocitose de detritos, o reparo tecidual e até mesmo a regeneração neural (GIBSON et al., 2019).

A administração de MTX utilizada em nosso estudo não foi, no entanto, capaz de induzir alterações neuronais e mielínicas capazes de serem detectadas à microscopia de luz, muito provavelmente em função de seu curto intervalo de administração. Alterações mielínicas mais discretas só seriam observáveis em estudos de microscopia eletrônica de transmissão.

A neurotoxicidade pelo uso do MTX é uma complicaçāo bem documentada, podendo ser aguda, subaguda ou retardada. Em geral, as formas aguda e subaguda sāo relativamente benignas e reversíveis, enquanto a forma tardia tende a ser mais séria e irreversível (TUXEN; HANSEN, 1994). Em humanos, altas doses de MTX podem causar encefalopatia aguda semelhante a derrame e leucoencefalopatia crônica (TUXEN; HANSEN, 1994).

Dentre os muitos efeitos descritos do MTX, pode-se incluir a estimulação de vias pró- e anti-inflamatórias (OLSEN et al., 2014). Sabe-se que a quimioterapia é capaz de induzir uma resposta inflamatória sistêmica, a qual, por sua vez, pode levar a doenças induzidas por citocinas (WOOD et al., 2006).

Os efeitos antiinflamatórios classicamente descritos para o MTX parecem estar relacionados com o aumento extracelular de adenosina e sua interação com receptores celulares de superfície específicos, com subsequente inibição da produção de IL-8 pelos leucócitos mononucleares sanguíneos, de IL-6 por monócitos e de metabólitos do ácido aracdônico, como o leucotrieno B4 (LB4) em neutrófilos (CRONSTEIN; NAIME; OSTAD, 1993; CHAN; CRONSTEIN, 2001). A redução dos níveis de IL-1 $\beta$  e de TNF- $\alpha$  no encéfalo dos ratos do grupo MTX5 está de acordo com os efeitos antiinflamatórios esperados e descritos na literatura para esta droga. No entanto, o aumento da IL-1 $\beta$  no grupo MTX10 permanece a ser esclarecido. Alguns autores sugerem que as alterações referentes à IL-1 estão mais relacionadas à diminuição da habilidade de resposta à IL-1 do que à inibição direta de sua produção (SEGAL et al., 1989).

Conforme demonstrado por De Koning et al. (2006), o MTX em doses altas pode induzir a mucosite, caracterizada por danos à mucosa gastrointestinal, contribuindo para uma diminuição de sua função de barreira e, consequentemente, elevando o risco de o indivíduo desenvolver infecções causadas por microrganismos originários do intestino. A mucosite está associada à secreção aumentada de citocinas, que podem induzir a resposta neuroinflamatória e a liberação de citocinas no SNC (WILSON et al., 2002; SERUGA et al., 2008). Esta secreção de citocinas causada por doença periférica pode levar a comprometimento central, que, por sua vez, estaria associado a um possível prejuízo cognitivo (BANKS et al., 2002).

Nesse contexto, é importante que estudos adicionais sejam realizados para melhor caracterizar os efeitos de curto prazo do MTX sobre a estrutura do SNC e

demais constituintes teciduais, particularmente sobre neurônios, células da micróglia, oligodendrócitos e OPCs, assim como sobre as bainhas de mielina.

## 8 CONCLUSÕES

A administração de curto prazo de MTX induziu astrogliose em todas as áreas estudadas (córtex frontal, hipotálamo, hipocampo e camadas molecular e granular do cerebelo), com aumento da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), tendo sido maior na dose de 10 mg/kg/dia em relação à de 5 mg/kg/dia.

Os níveis encefálicos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  diminuíram nos animais tratados com 5 mg/kg/dia, no entanto a IL-1 $\beta$  aumentou no grupo tratado com 10 mg/kg/dia.

## REFERÊNCIAS

- ABOLMAALI, S.S.; TAMADDON, A.M.; DINARVAND, R.A Review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 71, p. 1115-1130, 2013.
- ABBOTT, N.J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 41-53, 2006.
- AHLES, T.A.; ROOT, J.C.; RYAN, E.L. Cancer- and cancer treatment-associated cognitive changes: an update on the state of the science. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, p. 3675-3686, 2012.
- AHLES, T.A.; SAYKIN, A.J. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. **Nature**, v. 7, p. 192-201, 2007.
- ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 734-744, 2001.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-cellular específicos e ciclo celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-29, 2005.
- ALVAREZ, J.I.; DODELET-DEVILLERS, A.; KEBIR, H.; IFERGAN, I.; FABRE, P.J.; TEROUZ, S.; SABBAGH, M.; WOSIK, K.; BOURBONNIÈRE, L.; BERNARD, M.; VAN HORSSEN, J.; DE VRIES, H.E.; CHARRON, F.; PRAT, A. The hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. **Science**, v. 334, p. 1727-1731, 2017.
- ARGYRIOU, A.A.; ASSIMAKOPOULOS, K.; ICONOMOU, G.; GIANNAKOPOULOU, F.; KALOFONOS, H.P. Either called “chemobrain” or “chemofog”, the long-term chemotherapy induced cognitive decline in cancer survivors is real. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 41, p. 126-139, 2011.
- BANKS, W.A.; FARR, S.A.; MORLEY, J.E. Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, p. 319-327, 2002.
- BELANGER, M.; MAGISTRETTI, P.J. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, p. 281-295, 2009.
- BENVENISTE, E.N. Cytokines: Influence on glial cell gene expression and function. In: BLALOCK, J.E. **Neuroimmunoendocrinology**. Basel: Karger, 1992, p.106-153.
- BEUTLER, B. Tumor Necrosis Factor (TNF). In: H.L. HENRY; A.W. NORMAN **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, 2003. p. 536-539.
- BIGNAMI, A.; DAHL, D. **Glial cells in the central nervous system and the reaction to injury**. Austin: R.G. Landes, 1994. p. 108.

BOYKOFF, N.; MOIENI, M.; SUBRAMANIAN, S.K. Confronting chemobrain: an in-depth look at survivors' reports of impact on work, social networks, and health care response. **Journal of Cancer Survivorship**, v. 3, p. 223-232, 2009.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRODY, M.; BOHM, I.; BAUER, R. Mechanism of action of methotrexate: experimental evidence that methotrexate blocks the binding of interleukin 1 beta to the interleukin 1 receptor on target cells. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 31, p. 667-674, 1993.

BRUCE-GREGORIOS, J.H.; AGARWAL, R.P.; ORACION, A.; RAMIREZ, A.; LIN, L. Effects of methotrexate on RNA and purine synthesis of astrocytes in primary culture. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 50, p. 770-778, 1991a.

BRUCE-GREGORIOS, J.H.; SOUCY, D.M.; CHEN, M.G.; NORENBERG, M.D. Effect of methotrexate on glial fibrillary acidic protein content of astrocytes in primary culture. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 50, p. 118-125, 1991b.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p.1203-1207.

CAHOY, J.D.; EMERY, B.; KAUSHAL, A.; FOO, L.C.; ZAMANIAN, J.L.; CHRISTOPHERSON, K.S.; XING, Y.; LUBISCHER, J.L.; KRIEG, P.A.; KRUPENKO, S.A.; THOMPSON, W.J.; BARRES, B.A. A transcriptome database for astrocytes, neurons and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. **Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 264-278, 2008.

CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. Antineoplastic agents. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, G.A. **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw-Hill, 2002. p. 1399-1404.

CARON, J.E.; KRULL, K.R.; HOCKENBERRY, M.; JAIN, N.; KAEMINGK, K.; MOORE, I.M. Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 53, p. 551-556, 2009.

CHAN, E.S.I.; CRONSTEIN, B.N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Research**, v. 4, p. 266-273, 2002.

COLE, P.D.; KAMEN, B.A. Delayed neurotoxicity associated with therapy for patients with childhood leukemia. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 12, p. 174-183, 2006.

COLE, P.D.; VIJAYANATHAN, V.; ALI, N.F.; WAGSHUL, M.E.; TANENBAUM, E.J.; PRICE, J.; DALAL, V.; GULINELLO, M.E. Memantine protects rats treated with

intrathecal methotrexate from developing spatial memory deficits. **Clinical Cancer Research**, v. 19, p. 4446-4454, 2013.

CORREA, D.D.; ANGELIS, L.M.; SHI, W.; THALER, H.; GLASS, A.; ABREY, L.E. Cognitive functions in survivors of primary central nervous system lymphoma. **Neurology**, v. 62, p. 548-555, 2004.

CRONSTEIN, B.N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The anti-inflammatory mechanism of methotrexate: increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 2675-2682, 1993.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; PIZZORNI, C.; SERIOLO, B.; STRAUB, R. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 60, p. 729-735. 2001.

DE KEYSER, J.; MOSTERT, J.P.; KOCH, M.W. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. **Journal of the Neurological Science**, v. 267, n. 1-2, p. 3-16, 2008.

DE KONING, B.A.; VAN DIEREN, J.M.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D.J.; VAN DER, S.M.; MATSUMOTO, T.; YAMAGUCHI, K.; EINERHAND, A.W.; SAMSOM, J.N.; PIETERS, R.; NIEUWENHUIS, E.E. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. **International Immunology**, v. 6, p. 941-949, 2006.

DRACHTMAN, R.A.; COLE, P.D.; GOLDEN, C.B.; JAMES, S.J.; MELNYK, S.; AISNER, J. Dextromethorphan is effective in the treatment of subacute methotrexate neurotoxicity. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 19, p. 319-327, 2002.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes – implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, v. 54, p. 15-36, 1993.

ELBELTAGY M.; MUSTAFA, S.; UMKA, J.; LYONS, L.; SALMAN, A.; CHUR-YOE, G.T.; BHALLA, N.; BENNETT, G.; WIGMORE, P.M. Fluoxetine improves the memory deficits caused by the chemotherapy agent 5- fluorouracil. **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 112-117, 2010.

ERNST, P.B.; GARRISON, J.C.; THOMPSON, L.F. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. **The Journal of Immunology**, v. 15, p. 1993-1998, 2010.

ESPINOSA, E.; ZAMORA, P.; FELIU, Z.; BARÓN, M.G. Classification of anticancer drugs - A new system based on therapeutic targets. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, p. 515-523, 2003.

FERNAUD-ESPINOSA, I.; NIETO-SAMPEDRO, M.; BOVOLENTA, P. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. **Glia**, v. 8, p. 277-291, 1993.

FILOUS, A.R., SILVER, J. Targeting astrocytes in CNS injury and disease: a translational research approach. **Progress in Neurobiology**. v. 144, p. 173-187, 2016.

FONSECA, V.; GUBA, S.C.; FINK, L.M. Hyperhomocysteinemia and endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. **Endocrine Reviews**, v. 20, p. 738-759, 1999.

GALBIATTI, A.L.; CALDAS, H.C.; PADOVANI JUNIOR, J.A.; PAVARINO, E.C.; GOLONI-BERTOLLO, E.M. Sensitivity of human laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 to methotrexate chemotherapy. **Experimental Oncology**, v. 34, p. 367-369, 2012.

GIBSON, E.M.; NAGARAJA, S.; OCAMPO, A.; TAM, L.T.; WOOD, L.S.; PALLEGAR, 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-glial dysregulation that underlies chemotherapy-related cognitive impairment. **Cell**, v. 176, p. 43-55, 2019.

GREGORIOS, A.B.; MORA, J.; MARCILLO, A.; FOJACO, R.M.; GREEN, B. Morphologic alterations in rat brain following systemic & intraventricular methotrexate injection: light and electron microscopic studies. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 48, p. 33-47, 1989.

GREGORIOS, J.B.; SOUCY, D. Effects of methotrexate on astrocytes in primary culture: light and electron microscopic studies. **Brain Research**, v. 516, p. 20-30, 1990.

HALL, J.J.; BOLINA, M.; CHATTERLEY, T.; JAMALI, F. Interaction between low-dose methotrexate and nonsteroidal antiinflammatory drugs, penicillins, and proton pump inhibitors: A narrative review of the literature. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 51, p. 163-178, 2017.

HANISCH, U.K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, v. 40, p. 140-155, 2002.

HIDER, S.L.; BRUCE, I.N.; THOMSON, W. The pharmacogenetics of methotrexate. **Rheumatology**, v. 46, p. 1520-1524, 2007.

IARKOV, A.; APPUNN, D.; ECHEVERRIA, V. Post-treatment with cotinine improved memory and decreased depressive-like behavior after chemotherapy in rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, p. 1033-1039, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **O que é câncer?** 2018. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322). Acesso em: 06/08/2019.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Terapia Hormonal para Câncer de Mama Avançado.** 2014. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/terapia-hormonal-para-cancer-de-mamaavancado/6248/811/>. Acesso em: 06/08/2019.

JACOLA, L. M.; KRULL, K. R.; PUI, C. H.; PEI, D.; CHENG, C.; REDDICK, W. E.; CONKLIN, H. M. Longitudinal assessment of neurocognitive outcomes in survivors of

childhood acute lymphoblastic leukemia treated on a contemporary chemotherapy protocol. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, p. 1239-1247, 2016.

JANSEN, C.E.; COOPER, B.A.; DODD, M.J.; MIASKOWSKI, C.A. A prospective longitudinal study of chemotherapy-induced cognitive changes in breast cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 19, p. 1647-1656, 2010.

JANSEN, C.E.; MIASKOWSKI, C.; DODD, M.; DOWLING, G.; KRAMER, J. A metanalysis of studies of the effects of cancer chemotherapy on various domains of cognitive function. **Cancer**, v.104, p. 2222-2233, 2005.

JING, W.; CAMELLATO, B.; RONEY, I.J.; MADS, K.; GODIN, M. Measuring single-cell phenotypic growth heterogeneity using a microfluidic cell volume sensor. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1780-1789, 2018.

KADHIM, H.J.; DUCHATEAU, J.; SÉBIRE, G. Cytokines and brain injury: invited review. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 23, p. 236-249, 2008.

KAM, J.W.Y. Sustained attention abnormalities in breast cancer survivors with cognitive deficits post chemotherapy: An electrophysiological study. **Clinical Neurophysiology**, v. 127, p. 369-378, 2015.

KEIME- GUIBERT, F.; NAPOLITANO, M.; DELATRE J.Y. Neurological complications of radiotherapy and chemotherapy. **Journal of Neurology**, v. 245, p. 695-708, 1998.

KEARNEY, H.; PRICE, T.; CRYAN, J.; BEAUSANG, A.; LOOBY, S.; BRETT, F.M.; FARRELL, M. Acute multiple sclerosis lesion pathology does not predict subsequent clinical course - a biopsy study. **Irish Journal of Medical Science**, v. 188, p. 1427-1434, 2019.

KIM, J.; KIM, Y.; CHOI, J.; JUNG, H.; LEE, K.; KANG, J.; PARK, N.; RIM, Y.A.; NAM, Y.; JU, J.H. Recapitulation of methotrexate hepatotoxicity with induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, p. 357-372, 2018.

KIM, Y.S.; HONKANIEMI, J.; SHARP, F.R.; TÄUBER, M.G. Expression of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in the brain during experimental group B streptococcal meningitis. **Molecular Brain Research**, v. 128, p. 95-102, 2004.

KIMELBERG, H.K.; NEDERGAARD, M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. **Neurotherapeutics**, v. 7, p. 338-353, 2010.

KISHI, S.; GRIENER, J.; CHENG, C.; DAS, S.; COOK, E.H.; PEI, D. Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, p. 3084-3091, 2003.

KOLLING, J.; SCHERER, E.B.; DA CUNHA, A.A.; DA CUNHA, M.J.; WYSE, A.T. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: Prevention by folic acid. **Cardiovascular Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 67-73, 2010.

KREBS, C.; WEINBERG, J.; AKESSON, E. **Introdução ao Sistema Nervoso e à Neurofisiologia Básica**. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 6.

KRISHAN, A. What links cod liver oil, spinach, and flow cytometry? Flow cytometric detection and quantitation of folic acid receptors in tumor cells. **Cytometry Part A**, v. 71, p. 897-898, 2007.

LI, Y.; JIANG, L.; ZHANG, S.; YIN, L.; MA, L.; HE, D.; SHEN, J. Methotrexate attenuates the Th17/IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and RA patients. **Rheumatology International**, v. 32, p. 2415-2422, 2012.

LI, Y.; VIJAYANATHAN, V.; GULINELLO, M.E.; COLE, P.D. Systemic methotrexate induces spatial memory deficits and depletes cerebrospinal fluid folate in rats. **Pharmacological and Biochemical Behavior**, v. 94, p. 454-463, 2010a.

LI Y.; VIJAYANATHAN V.; GULINELLO M.E.; COLE P.D. Intrathecal methotrexate induces focal cognitive deficits and increases cerebrospinal fluid homocysteine. **Pharmacological and Biochemical Behavior**, v. 95, p. 428-433, 2010b.

LINNEBANK, M.; PELS, H.; KLECZAR, N.; FARMAND, S.; FLIESSBACH, K.; URBACH, H.; ORLOPP, K.; KLOCKGETHER, T.; SCHMIDT-WOLF, I.G.; SCHLEGEL, U. MTX-induced white matter changes are associated with polymorphisms of methionine metabolism. **Neurology**, v.64, p. 912-913, 2005.

LOUREIRO, S.O.; ROMÃO, L.; ALVES, T.; FONSECA, A.; HEIMFARTH, L.; MOURA NETO, V.; WYSE, A.T.; PESSOA-PUREUR, R. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. **Brain Research**, v. 1355, p. 151-164, 2010.

LYONS, L.; ELBELTAGY, M.; BENNETT, G.; WIGMORE, P. Fluoxetine counteracts the cognitive and cellular effects of 5-fluorouracil in the rat hippocampus by a mechanism of prevention rather than recovery. **Plos One**, v. 7, p. 300-310, 2012.

MADDEN, T.; EATON, V. E. Methotrexate. In: SCHUMACHER, E.G. **Therapeutic Drug Monitoring**. Norwalk: Appleton, 1995. p. 527-553.

MADHYASTHA, S.; SOMAYAJI, S.N.; RAO M.S.; NALINI, K.; BAIRY, K.L. Hippocampal brain amines in methotrexate-induced learning and memory deficit. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 80, p. 1076-1078, 2002.

MAHONEY, D.H. Jr.; SHUSTER, J.J.; NITSCHKE, R.; LAUER, S.J.; STEUBER, C.P.; WINICK, N.; CAMITTA, B. Acute neurotoxicity in children with b-precursor acute lymphoid leukemia: an association with intermediate-dose intravenous methotrexate and intrathecal triple therapy a Pediatric Oncology Group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, p. 1712-22, 1998.

MANTOVANI, A. Interleukin-1 (IL-1). In: H.L. HENRY; A.W. NORMAN **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, 2003. p. 405-412.

- MARQUES, F.; SOUSA, J.C.; CORREIA-NEVES, M.; OLIVEIRA, P.; SOUSA, N.; PALHA, J.A. The choroid plexus response to peripheral inflammatory stimulus. **Journal of Neuroscience**, v.144, p.424-430, 2007.
- MAYO, B.J.; STRINGER, A.M.; BOWEN, J.M.; BATEMAN, E.H.; KEEFE, D.M. Irinotecan-induced mucositis: the interactions and potential role of GLP-2 analogues. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 79, p. 233-249, 2016.
- McGUIRE, J.J. Anticancer antifolates: current status and future directions. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 2593-2613, 2003.
- MEYERS, C.A.; BYRNE, K.S.; KOMAKI, R. Cognitive deficits in patients with small cell lung cancer before and after chemotherapy. **Lung Cancer**, v. 12, p. 231-235, 1995.
- MIDDELDORP, J.; HOL, E.M. GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p. 421-443, 2011.
- MONTGOMERY, D.L. Astrocytes: form, function sand roles in disease. **Veterinary Pathology**, v. 31, p.145-167, 1994.
- MOURA-NETO, V.; LENT, R. Como funciona o sistema nervoso. IN: LENT, R. **Neurociência da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 61-88.
- MUNIR, F.; BURROWS, J.; YARKER, J.; KALAWSKY, K.; BAINS, M. Women's perceptions of chemotherapy-induced cognitive side effects on work ability: a focus group study. **Journal of Clinical Nursing**, v. 19, p. 1362-1370, 2010.
- MYERS, J.S. Chemotherapy-related cognitive impairment: Neuroimaging, neuropsychological testing, and the neuropsychologist. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 13, p. 413-421, 2009.
- NAGULU, M.; KIRAN, V.U.; REDDY, Y.N.; KRISHNA, D.R. Development and validation of rapid and sensitive HPLC method for the determination of methotrexate in human serum. **Stanford Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 8-13, 2009.
- NEDERGAARD, M.; RANSOM, B.; GOLDMAN, S.A. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 10, p. 523-530, 2003.
- NIGRO, L.; CATALDO, A.; SCHILIRO, G. Acute neurotoxicity in children with b-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) treated with intermediate risk protocols. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 35, p. 449-455, 2000.
- OLSEN, E.A.; DURHAM, M.D. The pharmacology of methotrexate. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 25, p. 306-318, 1991.

OLSEN, J. N.; SPURLOCK F. C.; MAUNE, M. T. Methotrexate induces production of IL-1 and IL-6 in the monocytic cell line U937. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, p. 1-8, 2014.

OMURO, A.M.; DEANGELIS, L.M.; YAHALOM, J.; ABREY, L.E. Chemoradiotherapy for primary CNS lymphoma: an intent-to-treat analysis with complete follow-up. **Neurology**, v. 64, p. 69-74, 2005.

PASCUAL, A.M.; CORET, F.; CASANOVA, B.; LÁINEZ, M.J. Anterior lumbosacral polyradiculopathy after intrathecal administration of methotrexate. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 15, p. 158-161, 2008.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 2192-2203, 2005.

PEREIRA, A.F.; COSTA, V.M.; SANTOS, M.C.M.; RIBEIRO, R.M.A.; SILVA, A.G.; PINTO, F.C.H.; VIDIGAL, P.V.T.; SILVA, G.R. Evaluation of the effects of methotrexate released from polymeric implants in solid Ehrlich tumor. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 68, p. 365-368, 2014.

PHATNANI, H.; MANIATIS, T. Astrocytes in neurodegenerative disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-17, 2015.

PHILLIPS, D.C.; WOOLLARD, K.J.; GRIFFITHS, H.R. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, p. 501-511, 2003.

POPA, C.; NETEA, M.G.; VAN RIEL, P.L.C.M.; VAN DER MEER, J.W.M.; STALENHOEF, A.F.H. The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 751-762, 2007.

QUINN, C.T.; GRIENER, J.C.; BOTTIGLIERI, T.; HYLAND, K.; FARROW, A.; KAMEN, B.A. Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in CSF of children who receive methotrexate for treatment of cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, p. 2800-2806, 1997.

RAFFA, R.B. A proposed mechanism for chemotherapy-related cognitive impairment ("chemo-fog"). **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 36, p. 257-259, 2011.

RAFFA, R.B.; TALLARIDA, R.J. Effects on the visual system might contribute to some of the cognitive deficits of cancer chemotherapy-induced "chemo-fog". **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, p. 249-255, 2010.

RAFFA, R.B.; DUONG, P.V.; FINNEY, J.; GARBER, D.A.; LAM, L.H.; MATHEW, S.S. Is "chemofog"/"chemo-brain" caused by cancer chemotherapy? **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 31, p. 129-138, 2006.

REDDICK, W.E.; TAGHIPOUR, D.J.; GLASS, J.O.; ASHFORD, J.; XIONG, X.; WU, S.; CONKLIN, H.M. Prognostic factors that increase the risk for reduced white matter

volumes and deficits in attention and learning for survivors of childhood cancers. **Pediatric Blood Cancer**, v. 61, p. 1074-1079, 2014.

RIVA, D.; GIORGI, C.; NICHELLI, F.; BULGHRONI, S.; MASSIMINO, M.; CEFALO, G.; GANDOLA, L.; GIANNOTA, M.; BAGNASCO, I.; SALEVITTI, V.; PANTALEONI, C. Intrathecal methotrexate affects cognitive function in children with medulloblastoma. **Neurology**, v. 59, p. 48-53, 2002.

ROCHE, V.F. Cancer and Chemotherapy. In: WILLIAMS, D.A.; T. L. LEMKE, T.L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry** Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. p. 1147-1192.

ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G.N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. **Trends in Neurosciences**, v. 23, p. 618-625, 2000.

SCHAGEN, S.B.; van DAM, F.S.; MULLER, M.J.; BOOGERD, W.; LINDEBOOM, J.; BRUNING, P.F. Cognitive deficits after postoperative adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. **Cancer**, v. 85, p. 640-50, 1999.

SCHERER, E.B.; LOUREIRO, S.O.; VUADEN, F.C.; da CUNHA, A.A.; SCHMITZ, F.; KOLLING, J.; SAVIO, L.E.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D.; NETTO, C.A., WYSE, A.T. Mild hyperhomocysteinemia increases brain acetylcholinesterase and proinflammatory cytokine levels in different tissues. **Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 2, p. 589-596, 2014.

SCHRODER, O.; STEIN, J. Low dose methotrexate in inflammatory bowel disease: current status and future directions. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, p. 530-537, 2003.

SEIGERS, R.; SCHAGEN, S. B.; COPPENS, C. M.; VAN DER MOST, P. J.; VAN DAM, F. S.; KOOLHAAS, J. M.; BUWALDA, B. Methotrexate decreases hippocampal cell proliferation and induces memory deficits in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 201, p. 279-284, 2009.

SEITZ, M.; ZWICKER, M.; LOETSCHER, P. Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, p. 2032-2038, 1998.

SERUGA, B.; ZHANG, H.; BERNSTEIN, L. J.; TANNOCK, I. F. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 887-899, 2008.

SEZER, A.; USTA, U.; CICIN, I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan induced intestinal mucositis and diarrhea. **Medical Oncology**, v. 26, n. 3, p. 350-357, 2008.

SHAO, Y.; JINGSHI, B.; ZHOU, Q. Methotrexate induces astrocyte apoptosis by disrupting folate metabolism in the mouse juvenile central nervous system. **Toxicology Letters**, v. 301, p. 146-156, 2019.

SINGH, S.; KUMAR, N.K.; DWIWEDI, P.; CHARAN, J.; KAUR, R.; SIDHU, P.; CHUGH, V.K. Monoclonal antibodies: A review. **Current Clinical Pharmacology**, v. 13, p. 85-99, 2018.

SINGH, U. V.; UDUPA, N. In vitro characterization of methotrexate loaded poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres and antitumor efficacy in Sarcoma-180 mice bearing tumor. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, p. 165-173, 1997.

SKUBISZ, M.M.; TONG, S. The evolution of methotrexate as a treatment for ectopic pregnancy and gestational trophoblastic neoplasia: a review. **ISRN Obstetrics & Gynecology**, v. 2012, p.1-8, 2012.

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

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

SOFRONIEW, M.V., VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, p. 7-35, 2010.

STIPURSKY, J.; ROMÃO, L.; TORTELLI, V.; NETO, V.M.; GOMES, F.C. Neuron glia signaling: implications for astrocyte differentiation and synapse formation. **Life Sciences**, v. 89, p. 524-531, 2011.

STIPURSKY, J.; SAMPAIO, L.S.; SPOHR, T.C.; ROMÃO, L.F.; GOMES, F.C.A. Neuron-astroglial interactions in cell fate commitment in the central nervous system. In: ULRICH, A.H. **Perspective of stem cells: from tools for studying mechanism of neuronal differentiation towards therapy**. London: Springer, 2010. v. 1. p. 145-164.

STIPURSKY, J.; SPOHR, T.C.; SOUSA, V.O.; GOMES, F.C. Neuron-astroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 11, p. 2402-2418, 2012.

TANAKA, H.; MATSUSHIMA, H.; MIZUMOTO, N.; TAKASHIMA, A. Classification of chemotherapeutic agents based on their differential in vitro impacts on dendritic cells. **Cancer Research**, v. 69, p. 6978-6986, 2009.

THOMSEN, A. M.; GULINELLO, M. E.; WEN, J.; SCHMIEGELOW, K.; COLE, P. D. Liposomal cytarabine induces less neurocognitive dysfunction than intrathecal methotrexate in an animal model. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 40, p. e91-e96, 2017.

TUXEN, M.K.; HANSEN, S.W. Neurotoxicity secondary to antineoplastic drugs. **Cancer Treatment Reviews**, v. 20, p. 191-214, 1994.

UEBERALL, M.A.; SKIRL, G.; STRASSBURG, H.M.; WENZEL, D.; HERTZBERG, H.; LANGER, T.; MEIER, W.; BERGER-JONES, K.; HUK, W.J.; KORINTHENBERG, R.; BECK, J.D. Neurophysiological findings in long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia in childhood treated with the BFM protocol 81 SR-A/B. **European Journal of Pediatrics**, v. 156, p. 727-733, 1997.

van DAM, F.S.A.M.; SCHAGEN, S.B.; MULLER, M.J.; BOOGERD, W.; WALL, E.V.D.; DROOGLEEVER FORTUYN M.E.; RODENHUIS, S. Impairment of cognitive function in women receiving adjuvant treatment for high-risk breast cancer: High-dose versus standard-dose chemotherapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, p. 210-218, 1998.

VANNUCCI, H.; MONTEIRO, T.H. Ácido fólico. ILSI Brasil-**Internacional Life Sciences Institute do Brasil**. v. 10, 2010. Disponível em: <https://ilsibrasil.org/wp-content/uploads/sites/9/2016/05/10-A%C3%A7ido-Fo%C3%A7ido.pdf>. Acesso em: 23/07/2019.

VARDY, J.; DHILLON, H. The fog hasn't lifted on "chemobrain" yet: ongoing uncertainty regarding the effects of chemotherapy and breast cancer on cognition. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, p. 35-37, 2010.

VASILE, F.; DOSSI, E.; ROUACH, N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. **Brain Structure and Function**, v. 222, p. 2017-2029, 2017.

VEZMAR, S.; BECKER, A.; BODE, U.; JAEHDE, U. Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. **Cancer Treatment**, v. 49, p. 92-104, 2003.

VIJAYANATHAN, V.; GULINELLO, M.; ALI, N.; COLE, P.D. Persistent cognitive deficits, induced by intrathecal methotrexate, are associated with elevated CSF concentrations of excitotoxic glutamate analogs and can be reversed by an NMDA antagonist. **Behavioural Brain Research**, v. 225, p. 491- 497, 2011.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nature**, v. 6, n. 8, p. 626-40, 2005.

WABER, D.P.; SHAPIRO, B.L.; CARPENTIERI, S.C.; GELBER R.D.; ZOU, G.; DUFRESNE, A. Excellent therapeutic efficacy and minimal late neurotoxicity in children treated with 18 grays of cranial radiation therapy for high-risk acute lymphoblastic leukemia: a 7-year follow-up study of the Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 87-01. **Cancer**, v. 92, p.15-22, 2001.

WALSH, A.; PALTIN, I.; GIOIA, G.; ISQUITH, P.; KADAN-LOTTICK, N.; NEGLIA, J.; BROUWERS, P. Everyday executive functions in standard-risk acute lymphoblastic leukemia survivors. **Child Neuropsychology**, v. 21, p. 78-89, 2015.

WANG, X.M.; WALITT, B.; SALIGAN, L.; TIWARI, A.F.; CHEUNG, C.W. Chemobrain: A critical review and causal hypothesis of link between cytokines and epigenetic reprogramming associated with chemotherapy. **Cytokine**, v. 72, p. 86-96, 2015.

WEIS, J.; POPPELREUTER, M.; BARTSCH, H.H. Cognitive deficits as long-term side-effects of adjuvant therapy in breast cancer patients: "subjective" complaints and "objective" neuropsychological test results. **Psychooncology**, v. 18, p. 775-782, 2009.

WEFEL, J.S.; SALEEBAA, A.K.; BUZDAR, A.U.; MEYERS, C.A. Acute and late onset cognitive dysfunction associated with chemotherapy in women with breast cancer. **Cancer**, v. 15, p. 3348-3356, 2010.

WEFEL, J.S.; LENZI, R.; THERIAULT, R.; BREZDEN, A.U.; CRUICKSHANK, S.; MEYERS, C.A. "Chemobrain" in breast carcinoma? **Cancer**, v. 101, p. 466-475, 2004.

WIENEKE, M.H.; DIENST, E.R. Neuropsychological assessment of cognitive functioning following chemotherapy for breast cancer. **Psychooncology**, v. 4, p. 61-66, 1995.

WILSON, C. J.; FINCH, C. E.; COHEN, H. J. Cytokines and cognition-the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 12, p. 2041-2056, 2002.

WOOD, L. J.; NAIL, L. M.; PERRIN, N. A. The cancer chemotherapy drug etoposide (VP-16) induces proinflammatory cytokine production and sickness behavior-like symptoms in a mouse model of cancer chemotherapy-related symptoms. **Biological Research for Nursing**, v. 2, p. 157-169, 2006.

ZHANG, Z.; ZHAO, P.; LI, A.; LV, X.; GAO, Y.; SUN, H.; DING, Y.; LIU, J. Effects of methotrexate on plasma cytokines and cardiac remodeling and function in postmyocarditis rats. **Mediators of Inflammation**, v. 2009, p. 1-9, 2009.

## ANEXO



[www.cruzeirodosul.edu.br](http://www.cruzeirodosul.edu.br)

Anália Franco  
Av. Regente Feijó, 1295  
03342-000 São Paulo SP  
T/F 55 11 2672 6200

Liberdade  
R. Galvão Bueno, 868  
01506-000 São Paulo SP  
T/F 55 11 3385 3000

São Miguel  
Av. Dr. Uziel Cirilo, 225  
08060-070 São Paulo SP  
T/F 55 11 2037 5700

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos Morfológicos da Administração do Quimioterápico Metotrexato sobre o Sistema Nervoso Central de Ratos", registrada com o nº 017\_2017, sob a responsabilidade de **Eduardo Fernandes Bondan** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chodata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE CRUZEIRO DO SUL, em reunião de 06/12/2017.

Finalidade	( ) Ensino      ( x ) Pesquisa Científica
Vigência de Autorização	05/2018 à 05/2019
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de Animais	30
Peso/Ideade	200-300 g / 4-6 meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Universidade São Paulo

*Sandro Massao Hirabara*  
 Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara  
 Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Universidade Cruzeiro do Sul