



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MICHELE ALBUQUERQUE JALES DE CARVALHO**

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO VALPROICO SOBRE A  
NEUROXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA: UMA  
ABORDAGEM COMPORTAMENTAL, NEUROQUÍMICA E  
HISTOLÓGICA.**

**FORTALEZA**

**2022**

**MICHELE ALBUQUERQUE JALES DE CARVALHO**

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO VALPROICO SOBRE A  
NEUROXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA: UMA  
ABORDAGEM COMPORTAMENTAL, NEUROQUÍMICA E  
HISTOLÓGICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles**

**Coorientadora: Profa. Dra. Juvenia Bezerra Fontenele**

**FORTALEZA**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- C325e Carvalho, Michele Albuquerque Jales de.  
Efeito protetor do ácido valproico sobre a neurotoxicidade induzida por cisplatina: uma abordagem comportamental, neuroquímica e histológica. / Michele Albuquerque Jales de Carvalho. – 2022.  
119 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Marta Maria de França Fonteles.  
Coorientação: Prof. Dr. Juvenia Bezerra Fontenele.

1. Ácido Valproico. 2. Disfunção cognitiva. 3. Neuroproteção. 4. Cisplatino. I. Título.

CDD 615.1

---

**MICHELE ALBUQUERQUE JALES DE CARVALHO**

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO VALPROICO SOBRE A  
NEUROXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA: UMA  
ABORDAGEM COMPORTAMENTAL, NEUROQUÍMICA E  
HISTOLÓGICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Juvenia Bezerra Fontenele (coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Jamile Magalhães Ferreira  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Profa. Dra. Camila Nayane de Carvalho Lima  
University of Texas Health Science Center at Houston (EUA)

A Deus, aos meus pais,  
aos meus filhos e ao meu marido.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Deus amado, bondoso e misericordioso, por permitir que meus sonhos possam se concretizar, que sempre me sustentou e me guiou, que me dá força e determinação para nunca desistir e sempre acreditar, enfrentar e superar cada desafio. Por ter me presenteado com uma família linda e com grandes amigos, parceiros e companheiros que contribuíram imensamente com essa pesquisa. Muito obrigada pela graça de chegar aonde estou!

*“Eu cantarei louvores à tua força; de manhã louvarei a tua fidelidade, pois tu és o meu alto refúgio, abrigo seguro nos tempos difíceis. Ó minha força, canto louvores a ti; tu és, ó Deus, o meu alto refúgio, o Deus que me ama.”* (Salmos 59: 16-17).

*“Tu és a luz que ilumina o meu caminho e a energia que me faz caminhar.”*

A Nossa Senhora de Fátima, por sempre interceder por mim, junto ao seu filho Jesus!

Aos meus pais queridos e amados, por vocês terem me dado a vida e por ser exemplo de honestidade, humildade, fé e muito amor! Por sempre sonharem com o melhor para mim! Graças a Deus que vocês são meus pais! Amo muito vocês!

Aos meus amados parceiros de vida, os meus irmãos! Amo-os imensamente!

Ao meu amado marido, que sempre me incentiva a crescer como pessoa e como profissional! Por toda a sua paciência e dedicação a nossa família e por ser exemplo de ser humano íntegro e ético! Você é muito importante para mim, amo muito você! Obrigada por tudo!

Aos meus dois amados e lindos filhos, vocês são minha maior missão, amo-os infinitamente! Tudo o que eu faço é, principalmente, por e para vocês! Vocês são a minha vida, os maiores e mais lindos presentes de Deus!

Aos meus companheiros e amores felinos, por me ensinarem o amor incondicional e serem minha companhia das inúmeras e extensas madrugadas em que eu estava me dedicando a elaboração deste trabalho.

A minha querida orientadora e amiga, Profa Dra. Marta Maria de França Fonteles, por todos os seus ensinamentos, pela confiança e credibilidade que deposita em mim. Você é um exemplo de ética e generosidade! Graças a Deus que existe no mundo pessoas bondosas e generosas como você!

A minha querida coorientadora Profa. Dra. Juvenia Fontenele, por sua generosidade, por ter confiado a mim sua brilhante ideia de projeto e por ter me inspirado e me ensinado muita coisa com sua didática e inteligência brilhantes!

Gratidão ao Dr. Francisco Helder Calvalcante Félix, médico oncologista do Centro Pediátrico do Câncer Infantil do Hospital Albert Sabin, colaborador e amigo, por todos os ensinamentos e disponibilidade!

Aos professores do Laboratório de Neuropsicofarmacologia Profa Dra. Danielle Macêdo, Profa. Dra. Silvânia Vasconcelos, Profa. Dra. Glauce Viana, vocês são grandes inspirações!

A querida Profa Dra. Clea Florenço, coordenadora do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, exemplo de gentileza, simpatia, dedicação e de grande profissional! Ser humano acolhedor, humilde e muito inteligente! Muito obrigada!

A minha amiga querida e técnica farmacêutica do laboratório de psicofarmacologia, Dra Kelly Rose. Obrigada pela sua amizade e ensinamentos!

Aos meus amigos e parceiros do laboratório de psicofarmacologia, que se tornaram irmãos do coração e minha segunda família:

Pedro Everson, meu grande amigo e irmão do coração, parceiro e companheiro de todas as horas! Muito obrigada por tudo!

A minha amiga querida Aline Marinho, primeira pessoa que conheci na pós-graduação, ainda antes de realizar a seleção! Obrigada por toda a força desde o início da minha caminhada!

A minha amiga Camila Nayane, que guiou os meus primeiros passos na pós-graduação e acompanha minha caminhada até hoje! Obrigada por todos os ensinamentos e por ser uma grande inspiração!

Ao meu amigo e irmão de coração João Victor, meu grande parceiro e companheiro! Muito obrigada por ser me ajudar em todas as horas, pela dedicação, gentileza e cuidado que sempre teve!

A minha amiga “muchacha”, companheira, “quase filha” (mas não tenho idade para ser mãe dela), Raica. Amo você demais! Obrigada por toda a nossa parceria e amizade!

A querida “Talitinha”, minha amiga Talita Matias, obrigada por toda a dedicação, amizade, cuidado, parceria e paciência. Você mora no meu coração!

Ao meu amigo lindo, querido, simpático, inteligente, criativo e tantos outros atributos, Adriano Chaves! Muito obrigada por ser tão gentil, dedicado e generoso! Serei eternamente grata a você!

Aos queridos Pedro Lorenzo e Ludmila e por toda parceria e contribuição! Obrigada pela disponibilidade, parceria e gentileza!

A querida amiga Juliete! Você é um ser humano maravilhoso e muito inteligente! Obrigada pela parceria e dedicação!

A Alana Gomes, farmacêutica competente e amiga gentil e companheira!  
Obrigada pela nossa parceria desde o início de tudo!

As queridas Paloma Jucá e Michelle Verde por toda gentileza, dedicação e parceria! Muito obrigada!

Ao querido Klistenes, que também está comigo desde o início, obrigada por toda a ajuda e parceria!

Ao amigo Dino César, grande farmacêutico, amigo e pai amoroso! Obrigada por sua amizade!

Ao Daniel querido, farmacêutico dedicado e competente, um grande amigo e grande exemplo de excelente filho para seus pais! Obrigada por toda a parceria e companheirismo!

A querida amiga Jamile, chegou a pouco no nosso grupo, um presente para nós!  
Obrigada pela amizade, dedicação e disponibilidade. Você é maravilhosa!

A todos meus queridos companheiros de grupo de pesquisa: Fernanda, Josimar, Emiliano, Jamile, Talita, Ítalo, João Victor, Raquel por toda a parceria, amizade e colaboração!

Enfim, a todos os colegas do Laboratório de Neuropsicofarmacologia pela amizade, colaboração e convivência agradável! Foram anos extremamente ricos para a minha vida!

Ao Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC e do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM-UFC), em especial a minha querida amiga médica veterinária Gabriela Mariângela por toda sua dedicação, amizade e ensinamentos e ao médico veterinário Dr Wesley Ribeiro por toda disponibilidade e dedicação.

Ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT-UFC) em especial ao técnico de laboratório Glautemberg de Almeida pela colaboração, parceria e dedicação!  
Muito obrigada!

A todos os funcionários e servidores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) sou muito grata por toda dedicação, amizade e cuidado! Em especial, sou muito grata a querida Laura, por toda sua simpatia e disponibilidade!

A minha amiga linda e querida Vilani, que contribuiu tanto com o Laboratório de Neuropsicofarmacologia por décadas e se tornou uma grande amiga! Obrigada por sua dedicação, companheirismo e carinho!

A querida Kátia Cilene, por toda amizade, gentileza e simpatia!



A querida Lena, que também foi técnica do Laboratório Neuropsicofarmacologia por sua colaboração e boa convivência!

A todos os professores que foram responsáveis pela minha formação, desde a educação infantil até os dias de hoje! Sem vocês eu não seria quem eu sou hoje, quanta admiração, gratidão e respeito tenho a todos! Muito obrigada!

Aos animais que sempre são de extrema importância para a ciência!

Ao CNPQ pelo apoio financeiro!

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento como profissional e ser humano e fazem da minha caminhada mais leve e feliz!

Muito Obrigada!

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.*

(Leonardo da Vinci)

## RESUMO

### **EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO VALPROICO SOBRE A NEUROXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA: UMA ABORDAGEM COMPORTAMENTAL, NEUROQUÍMICA E HISTOLÓGICA.**

A cisplatina é um fármaco antineoplásico, que apresenta grande eficácia no tratamento de inúmeros tipos de cânceres, porém, possui vários efeitos adversos, dentre eles: o efeito neurotóxico também conhecido como “*chemobrain*” que se manifesta com comprometimento da memória de trabalho, do funcionamento executivo, da atenção e da velocidade de processamento o que interfere no desempenho diário e na qualidade de vida dos pacientes. Atualmente, nenhum tratamento para esse efeito adverso foi aprovado. Ácido valproico é um fármaco antiepilético, utilizado também como estabilizador de humor e estudos recentes apontam para suas propriedades neuroprotetoras. O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos neuroprotetores do ácido valproico sobre a neurotoxicidade induzida por cisplatina em ratos, contextualizando uma abordagem comportamental, neuroquímica e histológica. Pensando na avaliação sistêmica e no custo-benefício para o paciente em tratamento com cisplatina, analisamos os efeitos da administração do ácido valproico, nas doses estudadas, sobre marcadores hematológicos, hepáticos e renais, como também, realizamos o estudo da curva de evolução do peso e das curvas de sobrevida e mortalidade. Considerando que as alterações comportamentais cognitivas, associadas a alterações colinérgicas, danos oxidativos, apoptose e danos mitocondriais estão possivelmente relacionados a esse efeito adverso, realizamos os testes comportamentais: campo aberto, labirinto em Y e NOR (reconhecimento de objeto novo), seguindo dos testes: determinação da enzima acetilcolinesterase (AChE), estudos dos parâmetros oxidantes e antioxidantes (TBARS, nitrito e GSH) em córtex pré-frontal e hipocampo, marcadores de apoptose caspase 3 e BCL2 por imunofluorescência em hipocampo e o estudo dos possíveis danos mitocondriais através dos testes “*swelling*” mitocondrial e o estudo do consumo de oxigênio mitocondrial cerebral. O protocolo experimental foi realizado durante 4 semanas. Semanalmente era administrado uma dose de 5mg/kg de cisplatina ou salina e, diariamente, por cinco dias consecutivos (com intervalo de dois dias entre um ciclo e outro) foi administrado ácido valproico na dose de 25mg/kg, ou 50mg/kg, ou salina, em ratos machos (300-350 gramas). Demonstramos que o tratamento com o ácido valproico, um fármaco que, dentre os mecanismos de ação, inibe enzima da histona desacetilase (HDAC), não contribuiu, nas doses estudadas, e nem causou alterações tóxicas hepáticas e renal importantes. Em relação aos parâmetros hematológicos, houve alteração apenas no número de plaquetas. o AVP demonstrou efeito benéfico favorecendo uma menor perda de peso, reduziu a mortalidade e aumentou a sobrevida dos animais tratados com cisplatina. Reverteu, mesmo que parcialmente, as deficiências cognitivas, como demonstrado no teste de labirinto em Y e NOR, associado a redução da atividade da enzima AChE. Como também, reverteu os danos oxidativos no córtex pré-frontal e hipocampo, reduziu a expressão de caspase 3 e aumentou a expressão de BCL2 em algumas regiões do hipocampo, associado à reversão dos danos mitocondriais induzidos pela cisplatina no cérebro analisado pelo teste de “*swelling*” mitocondrial e o estudo do consumo de oxigênio mitocondrial no cérebro. Achados que são clinicamente relevantes devido a evidências de que o tratamento oncológico com compostos à base de platina frequentemente desenvolve comprometimento cognitivo e anormalidades estruturais no cérebro.

PALAVRAS-CHAVE: cisplatina; comprometimento cognitivo, ácido valproico, neuroproteção.

# **PROTECTIVE EFFECT OF VALPROIC ACID ON CISPLATIN-INDUCED NEUROTOXICITY: A BEHAVIORAL, NEUROCHEMICAL AND HISTOLOGICAL APPROACH.**

## **ABSTRACT**

Cisplatin is an antineoplastic drug, which is highly effective in the treatment of numerous types of cancers, however, also presents several adverse effects, among them neurotoxicity, which manifests itself with impairment of working memory, executive functioning, attention, and processing speed, which interferes with the daily performance and patients' life quality. Currently, no treatment for this adverse effect has been approved. Valproic acid is an antiepileptic drug also used as a mood stabilizer that has recent studies focused on its neuroprotective properties. The aim of the present work was to study the neuroprotective effects of valproic acid on cisplatin-induced neurotoxicity in rats, contextualizing behavioral, neurochemical and histological approach. Thinking about the systemic effects and the cost-benefit for the patient in treatment with cisplatin, we analyzed the effects of the administration of valproic acid in the evaluation doses, on hematological, hepatic and renal markers, the curve of weight evolution as well as the survival and mortality curves. Considering that cognitive behavioral changes associated with cholinergic changes, oxidative damage, apoptosis and mitochondrial damage are possibly related to this adverse effect, we performed open field, Y maze and NOR (novel object recognition) tests. Were also performed determination of acetylcholinesterase (AChE), studies of oxidant and antioxidant parameters (TBARS, nitrite and GSH) in prefrontal cortex and hippocampus, markers of apoptosis caspase 3 and BCL2 by immunofluorescence in hippocampus and the study of possible mitochondrial damage by evaluating mitochondrial swelling and oxygen consumption. The experimental protocol was carried out for 4 weeks. A dose of 5mg/kg of cisplatin or saline was administered weekly, while valproic acid at a dose of 25mg/kg, or 50mg/kg or saline were administered for five consecutive days (with an interval of two days between one cycle and another). Male rats (300-350 grams) were used. It was demonstrated that treatment with valproic acid at the doses used on this study, did not contribute, nor did it cause significant hepatic and renal toxic changes. Regarding hematological parameters, there was change only in the number of platelets. AVP demonstrated beneficial effect, promoting less weight loss, higher life expectancy and diminished mortality on animals treated with cisplatin. It reversed, even partially, the cognitive deficiencies, as demonstrated in the Y-maze test and NOR, associated with the reduction of the AChE enzyme activity. It also reversed oxidative damage in the prefrontal cortex and hippocampus, reduced caspase 3 expression and increased BCL2 expression in some regions of the hippocampus, associated with the reversal of cisplatin-induced mitochondrial damage in the brain analyzed by the mitochondrial swelling and mitochondrial oxygen consumption. Findings that are clinically relevant because of evidence that cancer treatment with platinum-based compounds often develops cognitive impairment and structural abnormalities in the brain.

**KEYWORDS:** cisplatin; cognitive impairment, valproic acid, neuroprotection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Isômero de cis-diaminodichloroplatina (II). A molécula conta com dois radicais de NH <sub>3</sub> e dois Cl <sup>-</sup> .	<b>20</b>
<b>Figura 2</b>	Cisplatina modifica a conformação do DNA, ao se ligar na posição N7 na base de guanina, inibindo sua síntese e levando a morte celular por apoptose.	<b>22</b>
<b>Figura 3</b>	Ácido valproico	<b>27</b>
<b>Figura 4</b>	Esquema de Protocolo de Tratamento	<b>36</b>
<b>Figura 5</b>	Imagem representativa Teste do Campo Aberto (Open-field Test)	<b>37</b>
<b>Figura 6</b>	Desenho representativo do aparato do teste NOR	<b>39</b>
<b>Figura 7</b>	Desenho representativo do aparato do teste Labirinto em Y	<b>40</b>
<b>Figura 8</b>	Valores dos parâmetros hematológicos através das análises sanguíneas.	<b>47</b>
<b>Figura 9</b>	Valores dos parâmetros renais bioquímicos através das análises sanguíneas.	<b>47</b>
<b>Figura 10</b>	Valores dos parâmetros hepáticos bioquímicos através das análises sanguíneas.	<b>49</b>
<b>Figura 11</b>	Efeito do ácido valproico sobre o peso de ratos durante o período de submissão ao modelo neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>51</b>
<b>Figura 12</b>	Percentual de sobrevivência e de mortalidade de ratos durante o período de submissão ao modelo neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>53</b>
<b>Figura 13</b>	Número de cruzamentos (“crossing”) no campo aberto em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.	<b>54</b>
<b>Figura 14</b>	Atividade exploratória (“rearing”) no campo aberto em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.	<b>55</b>
<b>Figura 15</b>	Desempenho no teste labirinto em Y (Y maze) em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.	<b>56</b>
<b>Figura 16</b>	Desempenho no teste de reconhecimento do objeto novo (NOR) em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.	<b>57</b>

<b>Figura 17</b>	Efeito do ácido valpróico sobre o conteúdo de nitrito no hipocampo e córtex pré-frontal de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>58</b>
<b>Figura 18</b>	Efeito do ácido valproico sobre a peroxidação lipídica (substâncias reativas de ácido tiobarbitúico, TBARS) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.	<b>59</b>
<b>Figura 19</b>	Efeito do ácido valpróico sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo e córtex pré-frontal de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>60</b>
<b>Figura 20</b>	Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de AChE no córtex pré-frontal e hipocampo de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>62</b>
<b>Figura 21</b>	Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunoexpressão do marcador caspase 3 no hipocampo na região CA1 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>63</b>
<b>Figura 22</b>	Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunoexpressão do marcador caspase 3 no hipocampo na região CA2 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>64</b>
<b>Figura 23</b>	Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunoexpressão do marcador caspase 3 no hipocampo na região CA3 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>65</b>
<b>Figura 24</b>	Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunoexpressão do marcador caspase 3 no hipocampo na região DG (giro denteado) de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>66</b>
<b>Figura 25</b>	Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunoexpressão do marcador e BCL2 no hipocampo na região CA1 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>67</b>
<b>Figura 26</b>	Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunoexpressão do marcador e BCL2 no hipocampo na região CA2 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina.	<b>68</b>

- Figura 27** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunoexpressão do marcador e BCL2 no hipocampo na região CA3 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina. **69**
- Figura 28** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunoexpressão do marcador e BCL2 no hipocampo na região DG (giro denteado) de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade induzida por cisplatina. **70**
- Figura 29** Efeito *in vitro* da cisplatina sobre o Intumescimento mitocondrial isoladas de cérebros de ratos. **72**
- Figura 30** Efeito *in vitro* da cisplatina e da cisplatina associada ao ácido valpróico nas concentrações de 50 e 100ng sobre o Intumescimento de mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos. **74**
- Figura 31** Efeito *in vivo* do ácido valproico (50mg/kg/dia) em cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina (5mg/kg/sem) sobre o Intumescimento de mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos. **76**
- Figura 32** Efeito *in vivo* do ácido valproico em cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina sobre o consumo de oxigênio no estado 3, estado 4 e razão de controle respiratório (RCR) utilizando-se malato/glutamato como substrato. **78**
- Figura 33** Efeito *in vivo* do ácido valproico em cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina sobre o consumo de oxigênio no estado 4, estado 3, razão de controle respiratório (RCR) utilizando-se succinato como substrato. **79**



## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b>	Substâncias utilizadas no presente estudo	<b>35</b>
<b>Tabela 2</b>	Grupos experimentais	<b>36</b>

## **LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b>	Índice de discriminação do objeto	<b>39</b>
<b>Quadro 2</b>	Cálculo de percentual de alternâncias corretas	<b>40</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AchE</b>	Acetilcolinesterase
<b>AVP</b>	Ácido Valproico
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>BAX</b>	proteína intracelular pró-apoptótica
<b>BBB</b>	Barreira Hemato encefálica
<b>BDNF</b>	fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>BCL2</b>	regulador intracelular da apoptose
<b>CIS</b>	Cisplatina
<b>CREB</b>	Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc
<b>CPF</b>	córtex pré-frontal
<b>CA</b>	<i>cornu ammonis</i>
<b>DG</b>	giro denteado
<b>EROS</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GSH</b>	glutationa reduzida
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	glicogênio sintase quinase-3 $\beta$
<b>GRD</b>	Gânglio Raiz dorsal
<b>HDAC</b>	Histona desacetilase
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL10</b>	Interleucina 10

<b>iNOS</b>	Oxido Nitrico sintetase induzível
<b>NeuN</b>	Antígeno Neuronal Nuclear
<b>NFkB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>PSD95</b>	Proteína de Densidade Pós-sináptica 95
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>TGFβ</b>	Fator de transformação de crescimento β
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μM</b>	micromolar
<b>°C</b>	grau Celsius
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>h</b>	hora
<b>ml</b>	Mililitro
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>ng</b>	Nanograma
<b>mg</b>	miligrama
<b>mM</b>	Milimolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>1.1</b>	<b>Cisplatina</b>	<b>22</b>
<b>1.2</b>	<b>Neurotoxicidade e déficit cognitivo induzido por cisplatina</b>	<b>25</b>
<b>1.3</b>	<b>Ácido Valpróico</b>	<b>29</b>
<b>1.4</b>	<b>Ácido Valpróico e neuroproteção</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Drogas</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Protocolo de tratamento e delineamento experimental</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Grupos experimentais</b>	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise Hematológica e Bioquímica do Sangue</b>	<b>37</b>
<b>4.6.</b>	<b>Testes comportamentais</b>	<b>39</b>
	<b>4.6.1. Teste do Campo Aberto</b>	<b>39</b>
	<b>4.6.2. Reconhecimento de objeto novo (NOR)</b>	<b>40</b>
	<b>4.6.3. Labirinto em Y (Y-maze)</b>	<b>41</b>
<b>4.7</b>	<b>Determinação de parâmetros de estresse oxidativo</b>	<b>42</b>
	<b>4.7.1 Preparação de tecido</b>	<b>42</b>
	<b>4.7.2 Determinação do conteúdo de nitrito em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.</b>	<b>43</b>
	<b>4.7.3 Determinação de peroxidação lipídica (TBARS) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.</b>	<b>44</b>
	<b>4.7.4 Determinação da concentração cerebral de glutathiona reduzida (GSH) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.</b>	<b>45</b>
<b>4.8</b>	<b>Determinação da atividade de Acetilcolinesterase (AChE)</b>	<b>45</b>

<b>4.9</b>	<b>Imunofluorescência para caspase 3 e BCl 2</b>	<b>46</b>
<b>4.10</b>	<b>Isolamento Mitocondrial do cérebro</b>	<b>46</b>
4.10.1	Intumescimento mitocondrial do cérebro	46
4.10.2	Consumo de oxigênio mitocondrial no cérebro	47
4.10.3	Razão de controle respiratório mitocondrial cerebral (RCR)	47
<b>4.12</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Testes hematológicos e bioquímicos</b>	<b>49</b>
5.1.1	Efeito do Ácido Valproico sobre parâmetros hematológicos em ratos submetidos ao modelo neurotoxicidade induzida por cisplatina.	49
5.1.2	Efeito do Ácido Valproico sobre parâmetros renais bioquímicos em ratos submetidos ao modelo neurotoxicidade induzida por cisplatina.	50
5.1.3	Efeito do Ácido Valproico sobre parâmetros bioquímicos hepáticos em ratos submetidos ao modelo neurotoxicidade induzida por cisplatina.	51
<b>5.2</b>	<b>Avaliação do Efeito do Ácido valproico sobre o peso de ratos durante o período de submissão ao modelo neurotoxicidade induzida por cisplatina</b>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>Avaliação do efeito do Ácido Valproico sobre o percentual de sobrevivência e de mortalidade de ratos durante o período de submissão ao modelo neurotoxicidade induzida por cisplatina.</b>	<b>53</b>
<b>5.4</b>	<b>Testes Comportamentais</b>	<b>55</b>
5.4.1	Efeito do Ácido Valproico sobre a atividade locomotora no teste de Campo Aberto em ratos submetidos a modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.	55
5.4.2	Efeito do Ácido Valproico sobre o desempenho no teste labirinto em Y (Y maze) em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.	59
5.4.3	Efeito do Ácido Valproico sobre o desempenho no teste de reconhecimento do objeto novo (NOR) em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.	59
<b>5.5</b>	<b>Determinação de parâmetros de estresse oxidativo</b>	<b>60</b>
5.5.1	Determinação do conteúdo de nitrito em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.	60

5.5.2	Determinação de peroxidação lipídica (substâncias reativas de ácido tiobarbitúico, TBARS) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.	61
5.5.3	Determinação da concentração cerebral de glutathiona reduzida (GSH) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.	61
5.6	<b>Determinação da atividade de Acetilcolinesterase (AChE)</b>	62
5.7	<b>Análise por Imunofluorescência dos níveis de imunomarcção dos marcadores Caspase 3 e BCL2.</b>	63
5.7.1	Análise de imunomarcção para Caspase 3 em hipocampo de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina	64
5.5.2	Análise de imunomarcção para BCL2 em hipocampo de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.	68
5.8	<b>Estudo do Intumescimento de mitocôndrias (Mitochondrial Swelling)</b>	73
5.8.1	Intumescimento mitocondrial do cérebro (swelling mitocondrial – <i>in vitro</i> ).	73
5.8.1.1	<i>Efeito da cisplatina versus salina (controle) sobre o Intumescimento mitocondrial isoladas de cérebros de ratos.</i>	73
5.8.1.2	<i>Efeito da cisplatina versus cisplatina associada com ácido valproico sobre o Intumescimento mitocondrial isoladas de cérebros de ratos.</i>	75
5.8.2	Intumescimento mitocondrial do cérebro (swelling mitocondrial – <i>in vivo</i> )	78
5.8.2.1	<i>Efeito da cisplatina e da cisplatina versus ácido valpróico sobre o Intumescimento mitocondrial isoladas de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.</i>	78
5.7	<b>Consumo de oxigênio mitocondrial no cérebro</b>	79
6	<b>DISCUSSÃO</b>	82
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	103
8	<b>REFERÊNCIAS</b>	104

## 1. INTRODUÇÃO

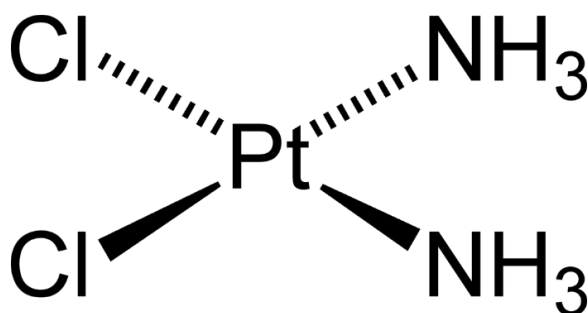
### 1.1 Cisplatina

Cisplatina (CDDP) é um composto antineoplásico, citotóxico, relacionado aos alquilantes. Sua inserção na quimioterapia do câncer, exprimiu grande marco na história da química inorgânica medicinal, se mostrando um fármaco eficiente nos mais variados tumores (CESAR, BERALDO, 2005). Embora eficaz na terapia anticâncer, a cisplatina é muito tóxica e tem efeitos secundários graves, afetando sistematicamente o organismo, propiciando o aparecimento de muitos efeitos secundários, não havendo tratamento específico para muitos deles (DASARI *et. al*, 2014; KHAN *et al.*, 2012; TCHOUNWOU *et. al*, 2021).

A atividade anticancerígena do fármaco foi descoberta de forma acidental. No início dos anos 60, estudando sobre as consequências de campos elétricos exercida sobre crescimento bacteriano. Rosenberg e colaboradores observaram que quando um campo elétrico era colocado em eletrodos de complexos de platina e submergido em solução aeróbica de *Escherichia coli*, as bactérias perdiam a capacidade normal de crescimento, adquirindo crescimento filamentosos cerca de 300 vezes acima do normal. Um produto gerado pela eletrólise dos eletrodos de platina, apontado como *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] era o agente causador desse fenômeno (ROSENBERG, B *et al.* 1969; ROSENBERG; VANCAMP, 1970) (Figura 1).

**Figura 1.** Isômero de *cis*-iaminodichloroplatina (II).

A molécula conta com duas moléculas de NH<sub>3</sub> e duas de Cl<sup>-</sup>.



Fonte: [www.shutterstock.com/pt/search/cisplatine](http://www.shutterstock.com/pt/search/cisplatine)

Posteriormente, tendo em vista como os compostos de platina eram capazes de inibir a divisão bacteriana sem matá-las, presumiu-se sua utilização para inibição de células tumorais (MANSI; THOMPSON, 1973; ROSENBERG, B *et al.* 1969; ROSENBERG; SHERMAN; LIPPARD, 1987; VANCAMP, 1970). Assim, na década de 70, muitos estudos foram realizados com objetivo de testar os efeitos da cisplatina e de outros compostos de platina em sarcomas implantados em ratos. Os resultados foram promissores, mostrando que a cisplatina era o mais eficaz composto contra o grupo de células estudado (ROSENBERG, 1980). A descoberta foi satisfatória, pois não existia até então outros fármacos anticâncer com tamanho grau de efetividade.

Em 1978 a cisplatina foi aprovada para uso clínico pela FDA (*Food and Drug Administration*) revolucionando o tratamento de tumores (SHERMAN, LIPPARD, 1987). Um ano depois o fármaco foi liberado no Reino Unido e Canadá, com posterior liberação a nível mundial, com nomes de neoplatina e platinol. Desde então, o fármaco é um dos agentes mais largamente utilizado em diversos tumores como de testículos, ovário, endométrio, pescoço, cabeça, bexiga, pulmões, linfomas, mama, esôfago, estômago e leucemia, entre muitos outros (NISHIKAWA *et al.*, 2001; OZ *et. al.*, 2015; OLIVEIRA, 2013; VALLE *et al.*, 2010; RYBAK *et al.*, 2009).

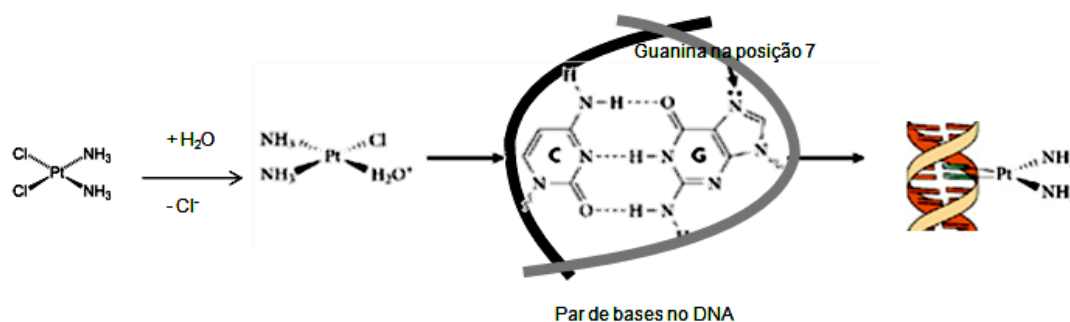
Em termos de mecanismo de ação, a atividade antitumoral da cisplatina é devido a sua ligação ao DNA, inibindo transcrição e replicação, formação de radicais livres, redução de mecanismos de defesa antioxidantes e a ativação da cascata das caspases, ocasionando apoptose (CARVALHO, 2009). O fármaco passa por reações contínuas de hidrólise para transformar-se em espécies ativadas, as quais reagem mais rapidamente com os alvos celulares (CEPEDA *et al.*, 2007; KLEIN; HAMBLEY, 2009). Essa hidrólise é favorecida pela baixa concentração de íons cloreto intracelular (3-20 mM), não sendo ainda bem esclarecido o meio pelo qual o fármaco chega ao interior da célula, mas acredita-se que a difusão passiva e o transporte ativo por transportadores de cobre e transportadores catiônicos orgânicos sejam relevantes nesse processo (JAMIESON; LIPPARD, 1999; KELLAND, 2007; SAFAEI; HOWELL, 2005).

Uma vez dentro da célula, os complexos ativos formados e altamente reativos da cisplatina interagem covalentemente com diversas porções nucleofílicas, dentre elas o DNA. O principal sítio de atuação é o nitrogênio 7 (N-7) da guanina, ainda que possa também ocorrer o mesmo tipo de ligação com a adenosina e citosina (LIPPARD, 2007;



RODRIGUES, 2013; TCHOUNWOU *et. al.*, 2021. Essa ligação forma um *cross-links* intrafita e interfita destorcendo a dupla hélice de DNA, interferindo assim na transcrição e replicação do material genético, provocando mudanças no ciclo celular, com posterior apoptose (CHO *et al.*, 2008; DASARI *et. al.*, 2014; TODD; LIPPARD; 2010).

**Figura 2:** Cisplatina modifica a conformação do DNA, ao se ligar na posição N7 na base de guanina, inibindo sua síntese e levando a morte celular por apoptose.



Fonte: [qnint.sbj.org.br](http://qnint.sbj.org.br)

O ciclo celular com parada do processo é uma ação trivial quando o DNA celular sofre algum dano. Quando em exposição à cisplatina, as células com DNA lesionado são induzidas a paralização na fase G2 do ciclo, uma ação essencial para induzir apoptose após exposição a droga (WANG; LIPARD, 2005). A morte programada por apoptose é iniciada caso o dano ao DNA não possa ser reparado. Assim, genes pró-apoptóticos regulados pela proteína p53, compreendendo BAX (“*BCL-2 associated protein X*”), elevam-se, culminando em liberação de citocromo C das mitocôndrias, seguido da quebra da pro-caspase 9 e ativação das caspases 3, 6 e 7 que danificam os componentes celulares importantes para sobrevivência celular (HAUPT *et al.*, 2003; KRUSE; GU, 2009; FLOREA; BUSSELBERG, 2011; JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2015). Dessa forma, a célula danificada é destruída evitando a passagem de genes alterados para células filhas.

Essa ação da cisplatina é altamente eficaz nas mais variadas células tumorais. Contudo, a ação citotóxica também se estende a tecidos e órgãos normais, favorecendo o aparecimento de severos efeitos secundários, considerados fatores limitantes para seu uso na clínica (CEPEDA *et al.*, 2007; DASARI *et. al.*, 2014; REBILLARD; LAGADIC-GOSSMANN; DIMANCHE-BOITREL, 2008). A resistência tumoral também é um

problema relacionado ao uso. Mecanismos como aumento na capacidade de reparo ao DNA, redução do acúmulo de compostos de platina intracelular e inativação da droga dentro citosol são ações envolvidas nessa mecânica de resistência (AMABLE, 2016). Tais mecanismos podem ocorrer isoladamente ou de modo concomitante (AMABLE, 2016; FERRY; HAMILTON; JOHNSON, 2000).

Uma vez desenvolvida resistência, a elevação da dose é necessária para o alcance da mesma eficácia, antes atingida com doses menores (LEE *et al.*, 2001). Contudo, o efeito tóxico aos tecidos saudáveis restringe esse aumento de dose, bem como efeitos farmacocinéticos que limitam a quantidade da droga que chega ao tumor (HOLOHAN *et al.*, 2013). Desse modo, afirma-se que a ação tóxica é dose dependente e possui efeito cumulativo (doses acima de  $300\text{mg}/\text{m}^2$ ). Esse acúmulo de concentrações eleva a gravidade dos efeitos secundários a cada ciclo de tratamento, dificultando a redução da toxicidade sem reduzir a eficácia do fármaco (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015; RAJESWARAN *et al.*, 2008; MACCIO; MADEDDU, 2013).

A toxicidade da cisplatina ocasiona efeitos gastrointestinais, como náuseas, vômitos, diarreia; além de mielossupressão; ototoxicidade; nefrotoxicidade e neurotoxicidade (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015; HORVATH *et al.*, 2006; PACE *et al.*, 2010; SANCHEZ-GONZALEZ *et al.*, 2011). Fármacos como oxaliplatina e carboplatina foram testadas e aprovadas pela FDA com objetivo de minimizar tais efeitos secundários (CHIORAZZI; SEMPERBONI; MARMIROLI, 2015). Todavia, a oxalapatina ocasiona neurotoxicidade periférica severa ao passo que a carboplatina induz poucos efeitos colaterais e menos neurotoxicidade, porém menos eficaz que a cisplatina, que continua sendo a droga mais neurotóxica entre os compostos de platina utilizados na clínica como quimioterápico (AMPTOULACH; TSAVARIS, 2011).

## **1.2 Neurotoxicidade e déficit cognitivo induzida por cisplatina**

O mecanismo de neurotoxicidade induzida pela cisplatina foi relacionado ao efeito cumulativo de repetidas administrações do fármaco. O primeiro relato de caso foi descrito no final da década de 70 por Kohen e Freemane (1979), quando observaram que uma paciente acometida por osteosarcoma e tratada com  $500\text{mg}/\text{m}^2$  de cisplatina apresentou dormência e formigamento nos membros. Esse efeito secundário acomete em média 50% dos pacientes em tratamento quimioterápico, dos quais aproximadamente (MILTENBURG; BOOGERD, 2014; PACE *et al.*, 2010). Ademais, problemas

neuropáticos crônicos e irreversíveis já foram relatados em cerca de 5-20% dos pacientes tratados (GREGG et al; 1992; STAROBOVA; VETTER; 2017).

O mecanismo envolvendo a neurotoxicidade ainda é incerto (KELLEY *et al.*, 2014), contudo, acredita-se que o meio principal esteja na formação e acúmulo de adutos da cisplatina quando em contato com DNA da célula neuronal (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI; 2015; AVAN *et al.*, 2015). O principal alvo é o gânglio da raiz dorsal (GRD), uma vez que possui características favoráveis como ausência de proteção da barreira hematoencefálica, transportadores catiônicos orgânicos que facilitam transporte da droga, bem como baixa quantidade de glutathione destoxicante (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015). Uma vez dentro do GRD, a cisplatina se acumula e persiste por tempo prolongado, prejudicando metabolismo e transporte axonal. Ainda que induza apoptose, o dano axonal parece anteceder a morte da célula e está atrelado a modificações em estruturas dos microtúbulos axonais encarregados pelo transporte axonal e crescimento de neuritos (QUASTHOFF; HARTUNG, 2002; HAUSHEER *et al.*, 2006).

A toxicidade neuronal pode acarretar a outros eventos que culminam na morte da célula, tais como, danos oxidativos, desregulação mitocondrial e mudanças no metabolismo energético, estão envolvidos na mecânica da injúria e apoptose neuronal ocasionada pela cisplatina (CAROZZI; MARMIROLI; CAVALETTI, 2010; MACCIO; MADEDDU, 2013).

A mitocôndria é a organela tida como principal alvo de estresse oxidativo, de forma que danos em sua estrutura acarreta elevação na síntese de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequente elevação do estresse oxidativo (MCDONALD; WINDEBANK, 2002). Em complemento, as defesas antioxidantes mediadas por glutathione reduzida (GSH), enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase encontram-se reduzidas (SRIVASTAVA *et al.*, 2010), contribuindo ainda mais para o dano neuronal.

Com o descontrole nos mecanismos de oxirredução, a integridade da membrana mitocondrial fica ameaçada. A quebra dessa integridade ocasiona redução na síntese de adenosina trifosfato (ATP) e liberação aumentada de caspases, que induz a célula à morte por apoptose (PAROLIN; REASON, 2001). Evidências apontam mecanismo de indução de apoptose da célula neuronal pela ativação de caspases 3 e 7 por intermédio da via BAX-mitocondrial-citocromo C, união ao DNA mitocondrial ou ainda inibição da transcrição e/ou produção de proteínas mitocondriais, com consequente perda de função da organela (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015; WINDEBANK;

GRISOLD, 2008). Um estudo *in vitro* com cultura de células neuronais do GRD demonstrou redução de mitocôndrias funcionais, perda de potencial membranar e modificações estruturais após exposição a concentrações tóxicas de cisplatina (MELLI *et al.*, 2008), as quais são sinais de degeneração vacuolar.

O dano ao DNA mitocondrial é ocasionado pela formação de adutos da cisplatina com o material genético. Evidências *in vitro* e *in vivo* mostraram que a formação de adutos ocasiona inibição de replicação do material genético, vacuolização mitocondrial e degradação do neurônio (PODRATZ *et al.*, 2011; ONGNOK *et al.*, 2020). Por não possuir sistema de reparo de DNA (CANTA; POZZI; CAROZZI, 2015), a formação dos adutos podem provocar falhas energéticas e estender a neurotoxicidade da cisplatina, uma explicação plausível atribuída a piora de sintomas neuropáticos vistos posteriormente a interrupção do tratamento com a cisplatina (GRUNBERG *et al.*, 1989). O dano mitocondrial também está associado a diversas doenças psiquiátricas (MANJI *et al.*, 2012) e neurológicas como doença de Huntington (REDDY; SHIRENDEB, 2012); doença de Alzheimer (LEE *et al.*, 2012), doença de Parkinson (FERRER *et al.*, 2012) e doença de Batten (LUIRO *et al.*, 2006).

Os neurônios carregam muitas mitocôndrias, especialmente nas regiões dendríticas, que são extremamente vulneráveis à cisplatina. O dano mitocondrial nas regiões dendríticas e sinápticas é uma complicação grave induzida pela cisplatina, já demonstrado em estudos anteriores através de redução nas proteínas sinápticas, como sinaptofisina e proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD95) no hipocampo de camundongos (MA *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2016).

Apesar da passagem da cisplatina através da barreira hematoencefálica (BBB) seja limitada, ela ainda pode causar neurotoxicidade grave no cérebro (TCHOUNWOU *et al.*, 2021; ONGNOK *et al.*, 2020). Além disso, embora pouco discutido, a neurotoxicidade atrelada ao tratamento com cisplatina pode afetar funções cognitivas de pacientes (AMIDI *et al.*, 2017; ONGNOK *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2019).

Essas funções são formadas pela memória, raciocínio, aprendizado, atenção, linguagem, habilidades espaços visuais (reconhecimento de objetos e pessoas, percepção de movimento, localização e orientação no espaço), capacidade de planejamento e tomada de decisão e são essenciais na relação do sujeito consigo e com o meio que está inserido (LENT, 2010; SHATIL *et al.*, 2014; UNTURA e REZENDE; 2012).

Na cognição, estão inclusas também, as funções executivas que envolvem a velocidade de processamento de informações, o desejo, a impulsividade, a memória de trabalho ou operacional e a capacidade de auto-regulação ou flexibilidade cognitiva, que são estímulos importantes para se adquirir novos conhecimentos e, a partir deles, desenvolver a aprendizagem (BIRLE *et. al.*, 2021; DIAMOND, 2013; LENT, 2008). Essas são mediadas pelo córtex pré-frontal e são essenciais para o comportamento voltado ao cumprimento de objetivos, tais como estudar para uma prova ou a capacidade de escolher dentre diversas alternativas (LOGUE & GOULD, 2014; DIAMOND, 2012; LENT, 2008).

A memória é a função cognitiva que corresponde a capacidade de aquisição, formação, armazenamento e evocação de informações, porém, para que essa ocorra, é necessário as outras funções, tais como, as funções executivas (IZQUIERDO, 2002; LENT, 2010). Diversas regiões do cérebro estão envolvidas no processo de armazenamento da memória, tais como: amígdala, córtex órbito-frontal, hipocampo, hipotálamo, dentre outras. O prejuízo de tais funções impactam diretamente em atividades relacionadas a execução de atividades fundamentais a sobrevivência, relações sociais, atuação profissional e qualidade de vida (HECKTHEUER, 2009). O fenômeno do declínio cognitivo desenvolvido a partir do tratamento quimioterápico é referido como comprometimento cognitivo induzido por quimioterapia (CICI) ou “*chemobrain*” (ONGNOK *et. al.*, 2020).

O comprometimento cognitivo causado pela cisplatina (“*chemobrain*”) abrange uma ampla gama de problemas neurológicos, como deficiências na memória, atenção, clareza de pensamento, funcionamento executivo e velocidade de processamento de informações (ABDEL-WAHAB *et. al.*, 2019; CHIU *et. al.*, 2017). Esses déficits cognitivos geralmente duram muito tempo e afetam negativamente a qualidade de vida (CHIU *et. al.*, 2017; LOMELI *et. al.*, 2014; ONGNOK *et. al.*, 2020).

Efeitos de danos cognitivos foram observados através de estudos pré-clínicos utilizando diversas técnicas e modelos animais e clínicos utilizando técnicas avançadas de imagem (XIAO *et. al.*, 2018). Alterações podem ser observadas no comprometimento da memória de trabalho, memória de curto prazo, memória viso espacial, funcionamento executivo, atenção e agilidade de processamento descrito em vários estudos clínicos com

pacientes que receberam terapia com cisplatina (JOHN *et al.*, 2017; SCHAGEN *et al.*, 2008; GAN *et al.*, 2011; ONGNOK *et. al.*, 2020; XIAO, 2018; ZHOU *et.al.*, 2017).

Algumas evidências pré-clínicas complementam essas constatações, demonstrando que alterações bioquímicas também são observadas (CHTOUROU *et al.*, 2015). Oz (2015), que estudava quais efeitos a cúrcuma exercia sobre o déficit cognitivo induzido por cisplatina ou “*chemobrain*” em ratos, demonstrou que os animais tratados com a droga durante cinco semanas ininterruptas apresentaram disfunção do sistema colinérgico, elevação dos níveis de MDA (malondialdeído) e diminuição da atividade da SOD (superóxido dismutase) no hipocampo e plasma. Algumas outras substâncias além da cúrcuma, como acetilcisteína, amifostina, cálcio, magnésio, ditiocarbamato de dietilo, glutathione e vitamina E (ALBERS *et al.*, 2011), foram testadas como possíveis agentes de intervenção para neurotoxicidade induzida por cisplatina. No entanto, as informações são escassas para afirmar que tais agentes previnem ou reduzem a neurotoxicidade e novos agentes como ácido valproico estão em pauta.

### 1.3 Ácido valproico

Ácido valproico (AVP) é um ácido graxo simples de cadeia ramificada de oito carbonos (Figura 3) com propriedades anticonvulsivantes únicas (CHATEAUVIEUX *et al.*, 2010; LÖSCHER, 1999; SINGH *et. al.*, 2021). Derivado de ácido-2-propivalérico, foi sintetizado pela primeira vez por B.S. Burton em 1882 por acaso quando era usado como solventes orgânicos (BURTON, 1882), contudo não se tinha ainda uso clínico conhecido até que a atividade anticonvulsivante foi eventualmente descoberta por Pierre Eymard em 1962 e publicado por Meunier e colaboradores (MEUNIER *et al.*, 1963).



Estudos pré-clínicos e clínicos ainda mostraram que o AVP modula transmissão serotoninérgica e dopaminérgica, o que destaca sua eficácia em distúrbios psiquiátricos e distúrbios neurológicos (LÖSCHER, 1999). Posteriormente, o AVP mostrou ação em histonas deacetilases (HDAC), as quais são uma família de enzimas importantes reguladoras da estrutura e transcrição da cromatina, podendo modular a expressão de vários genes, bem como influenciar o crescimento, invasão e diferenciação do tumor (CHATEAUVIEUX *et al.*, 2010; GOTTLICHER, 2004; GURVICH *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2018;). Com isso, tem sido apontado como droga anticancerígena, potencializando as ações dos quimioterápicos (GÖTTLICHER *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-MENENDEZ *et al.*, 2008).

Entre todos os fármacos antiepiléticos, o AVP é singular pelo largo espectro de eficácia contra as síndromes epiléticas e convulsões em adultos e crianças (LÖSCHER, 1993; MONTI *et al.*, 2009). É um fármaco que atua em diversos alvos, com potente ação anti-inflamatória, anti-nociceptiva quando em doses baixas, um efeito atrelado a inibição das vias relacionadas ao fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Daí a sua utilização em enxaquecas e em doenças psiquiátricas (XIMENES *et al.*, 2013). Nos últimos anos, as ações neuroprotetoras do AVP foram descritas em uma gama de modelos de lesão aguda do Sistema Nervoso Central, dentre elas acidente vascular cerebral, hipóxia, lesão traumática, lesão medular e isquemia global transitória (XIMENES *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2014).

#### **1.4 Ácido valpróico e neuroproteção**

Neuroproteção é um termo que alude aos mecanismos induzidos bioquimicamente para prevenir, resistir ou lidar com um risco neuronal específico. As vias implicadas nessa neuroproteção podem advir de alterações celulares clínicas, estruturais, elétricas e moleculares (ROMOLI *et al.*, 2019). Entretanto, apesar de estudos apontarem a atuação do AVP em diversos modelos animais e patologias neurológicas, como descritas anteriormente, ainda há necessidade de maiores estudos com modelos animais que converjam com ensaios clínicos bem implementados, com intuito de reduzir resultados conflitantes com o panorama clínico.

Citando o cenário de evidências, o AVP funcionou como neuroprotetor em modelo animal de doença de Parkinson (DP) induzido por inibidor irreversível de



proteassoma (HARRISON; ANIS; DEXTER, 2016; HARRISON; DEXTER; 2013; XIMENES et. Al, 2015). O inibidor, que ocasionou perda neuronal, principalmente na área tegmentar ventral e substância negra, teve seu efeito neutralizado por tratamento com AVP. Os autores investigavam o efeito do AVP intermediado pela inibição de HDACs e mostraram que AVP conferiu neuroproteção por inibição delas. Em modelo *in vivo* da doença o tratamento com AVP trouxe efeitos positivos na prevenção de apoptose (PAN *et al.*, 2005), proteção neuronal contra toxina dopaminérgica 1-metil-fenilpiridínio (CHEN *et al.*, 2009), liberação da substância trófica da glia (CHEN *et al.*, 2006) e proteção neuronal por aumentando de expressão de  $\alpha$ -sinucleína (MONTI *et al.*, 2009).

Ainda o tratamento por sete dias com AVP foi capaz de inibir peroxidação lipídica e oxidação proteica induzida por FeCl (WANG; AZZAM, YOUNG, 2003) em cultura de células corticais de ratos, além de aumentar a expressão do fator antiapoptótico Bcl-2, o qual tem função de regular o potencial de membrana mitocondrial e inibir liberação do citocromo c, reduzindo estresse oxidativo e aglomerado de radicais óxidos (CHU, ZHOU, LU *et. al.*, 2015; HAIM, 2006; GESSA *et al.*, 1995 XIMENES *et. al.*, 2015).

Em acréscimo, por intermédio de inibição de HDAC, o AVP inibe a síntese de mediadores inflamatórios (ex: TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-6), regula positivamente HSP70, HSP27, pAkt (proteínas neuroprotetoras) e negativamente o fator p53, vinculado a apoptose, e elevação de neurotrofinas, como BDNF (do inglês “*Brain-derived neurotrophic factor*”, ou fator neurotrófico derivado do cérebro) importantes para preservação de neurônios e oligodendrócitos (CHU *et. al.*, 2015). A neuroproteção por inibição de histonas também foram observados em modelo de isquemia por oclusão da artéria cerebral média (WANG *et al.*, 2011), modelo *in vitro* de privação de glicose e oxigênio (COSTA *et al.*, 2006), excitotoxicidade induzida por glutamato (KANAI *et al.*, 2004) e morte neuronal dopaminérgica (ACHARYA; BUSSEL, 2000).

Além da inibição de HDAC, o AVP também inibe GSK3 $\beta$  (JELLINGER, 2011). A Glicogênio sintase quinase-3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) é uma quinase proteica, enzima capaz de modular diversos aspectos da função neural, como: a plasticidade sináptica, a estrutura neuronal, a expressão gênica e a resiliência neuronal (DOBLE and WOODGETT 2003, JOPE and JOHNSON, 2004). Tal proteína é abundantemente expressa em diversas áreas cerebrais, a saber: hipocampo, córtex cerebral e estriado (YAO *et al.* 2002).

Diversas moléculas fosforiladas pela GSK podem explicar sua relevância na neuroproteção. Por exemplo, a ativação desta enzima inibe o CREB (proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc) e a  $\beta$ -catenina (QUEIROZ *et al.*, 2004). Além do mais, a GSK3 regula diretamente os sistemas neurotransmissores dopaminérgico, glutamatérgico e serotoninérgico (JOPE; ROH 2006) e (BEAULIEU *et al.* 2009).

As propriedades neuroprotetoras do AVP também foram descritas na doença de Huntington, neurotoxicidade induzida pelo beta-peptídeo amiloide, esclerose lateral amiotrófica (ELA) (MISHRA; CHAUDHARY; KUMAR, 2014; MARK *et al.*, 1995) e no tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne, uma doença degenerativa do músculo esquelético (GURPUR *et al.*, 2009). Neste último, o AVP foi suficiente para induzir a via Akt/mTOR/p70S6K, através da indução da fosfatidilinositol 3-OH quinase (PI3K), ocasionando em redução na quantidade de colágeno e fibrose, redução das contraturas dos membros superiores e inferiores, redução de células inflamatórias e elevados níveis de Akt ativado nos músculos. Diante desses achados o AVP demonstra ser um fármaco bastante promissor no que diz respeito a neuroproteção na neurotoxicidade induzida por cisplatina.

## **2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

A neurotoxicidade é um dos efeitos adversos do tratamento contra o câncer e foi caracterizada como sendo um dos mais graves problemas associados a quimioterapia com a cisplatina e, devido a esse cenário, tem sido alvo de especial atenção, uma vez que pode causar limitações, podendo provocar atrasos ou interrupção do tratamento e consequentemente resultados inferiores em termos de resposta e sobrevida. Há também o risco de ocasionar graves complicações neurológicas, prejuízos cognitivos e motores, convulsão, perda auditiva e visual (MCWHINNEY; GOLDBERG; MCLEOD, 2009; ONGNOK *et. al.*, 2019; XIAO *et. al.*, 2018).

Aproximadamente metade dos pacientes que receberam o tratamento com a droga apresentam problemas neuropáticos que variavam entre sintomas moderados a grave que culminam muitas vezes em abandono do tratamento quimioterápico (WOLF *et al.*, 2008). Cabe ressaltar que, numerosas pesquisas trazem a neuropatia associada a cisplatina, contudo, são escassas as que descrevem a neurotoxicidade do sistema nervoso central (ALMUTAIR *et al.*, 2017; OWOEYE; ADEDARA; FAROMBI, 2018).

O prejuízo cognitivo ou “*chemobrain*” tem consequências diretas na vida do paciente, interferindo nas atividades de vida diária relacionadas à capacidade do indivíduo em executar, de forma independente, as atividades consideradas essenciais à sua sobrevivência e, conseqüentemente, na manutenção de suas relações sociais, prejudicando, também, o desempenho profissional, causando grandes impactos na sua qualidade de vida (AMIDI *et. al*, 2017; HECKTHEUER *et al*, 2009; AHLES *et. al*, 2007; ZENG *et. al.*, 2019).

Como já discutido, inúmeros mecanismos foram pressupostos para as ações neurotóxicas ocasionadas por cisplatina, dentre elas o dano oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, apoptose e radicais livres, por levar a danos ao DNA celular (CAROZZI; MARMIROLI; CAVALETTI, 2010; KAWAI *et al.*, 2006; MACCIO; MADEDDU, 2013). Adicionalmente, a cisplatina pode lesionar DNA mitocondrial através de formação de adutos que culminam em falha energética, além de ocasionar danos cognitivos por vezes permanentes.

É de conhecimento da comunidade científica que a cisplatina é eficaz, portanto, a sua utilização é de grande importância, apesar da vastidão de efeitos adversos associados. Por isso, o estudo de substâncias que sejam seguras e capazes de atuar como coadjuvante na proteção da neurotoxicidade é o principal objetivo aqui trabalhado. Somando-se a isso, em virtude do estresse oxidativo e da apoptose serem pontos marcantes na neurotoxicidade induzida por cisplatina, a utilização de uma droga que possua ação contrários processos pode trazer novas perspectivas de tratamento a neurotoxicidade.

O AVP é um fármaco já utilizado há décadas, uma droga bem conhecida e tolerada, é amplamente utilizado para tratamento de diversos distúrbios neurológicos e psiquiátricos (epilepsia, enxaquecas, transtornos de humor e dor neuropática). Além disso, demonstra efeitos na remodelação gênica por inibir a enzima HDAC. Atualmente, vários estudos têm demonstrado seus efeitos neuroprotetores em doenças neurodegenerativas (CHU *et. al*, 2015; CHEN, 2014; LV, 2011; XIMENES *et. al*, 2015), ação protetora contra neuropatia periférica causada por cisplatina (RODRIGUEZ-MENENDEZ *et. Al*, 2008), em lesões agudas no SNC (CHIU *et. al*, 2017) e proteção de neurônios hipocâmpais de danos por radiação (THOTALA *et. al.*, 2015).

Estudos anteriores demonstram que o AVP possui efeitos sinérgicos com a cisplatina e outros antineoplásicos, atuando também no tratamento anticancerígeno (CAPONIGRO *et. al.*, 2016; FELIX *et al*, 2011; IANNELLI *et. al.*, 2020). Portanto, além da ação neuroprotetora, o AVP possui outra vantagem, por atuar sinergicamente como anticancerígeno. Portanto, a relevância do presente estudo encontra-se diante do fato de que, até o momento, não há relatos na literatura científica do efeito neuroprotetor do AVP contra a toxicidade cerebral induzida pela cisplatina não foi relatado, assim, seus efeitos poderão ser investigados pela primeira vez.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar os efeitos neuroprotetores do ácido valproico sobre a toxicidade induzida por cisplatina em ratos, contextualizando uma abordagem comportamental e neuroquímica e histológica.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as possíveis alterações comportamentais causadas aos ratos pela administração de cisplatina, tais como: atividade locomotora, e memória de trabalho e memória recente, bem como prevenção e/ou reversão dessas alterações pelo uso do ácido valproico;
- ✓ Analisar hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, leucócitos totais, AST, ALT, ureia e creatinina no soro dos ratos submetidos ou não ao tratamento com cisplatina, bem como prevenção e/ou reversão de alterações pelo uso do ácido valproico
- ✓ Avaliar parâmetros de estresse oxidativo (nitrito, TBARS), defesas antioxidantes (GSH) e atividade de Acetilcolinesterase (AChE) em córtex pré-frontal e hipocampo dos ratos submetidos ou não ao tratamento com cisplatina, bem como prevenção e/ou reversão de alterações pelo uso do ácido valproico.
- ✓ Observar por imunofluorescência os marcadores caspase 3 e BCL 2 no hipocampo de cérebro de ratos que foram submetidos ao modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina que receberam tratamento com salina ou ácido valproico.
- ✓ Estudar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da cisplatina e da cisplatina associada ao ácido valproico sobre o intumescimento mitocondrial isoladas de cérebros de ratos.

- ✓ Investigar os parâmetros respiratórios mitocondriais em cérebro de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina e o efeito do ácido valpróico sobre esses parâmetros.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos *Wistar* machos adultos (peso: 250-350 g), obtidos no biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) sempre no mesmo horário, no caso dos experimentos comportamentais entre 10:00 e 16:00. Foram utilizados 8 animais por grupo, sendo os mesmos divididos aleatoriamente e mantidos em caixas de acordo com seus respectivos tratamentos, com um ciclo claro/escuro de 12 h, água e ração animal *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com aprovação pelo comitê de ética e pesquisa animal (CEPA-UFC) sob o registro 88/2017.

### 4.2. Drogas

As substâncias utilizadas no presente estudo encontram-se descritas na tabela a seguir:

**Tabela 1:** substâncias utilizadas no presente estudo

<b>Droga</b>	<b>Preparo</b>	<b>Via de administração</b>
Cisplatina (CITOPLAX <sup>®</sup> )	Solução injetável 1mg/ml	Via intraperitoneal (IP)
Ácido Valpróico (DEPAKENE <sup>®</sup> )	Diluído 50mg/ml em solução salina 0,9%	Via intraperitoneal (IP)

Fonte: próprio autor

### 4.3. Grupos experimentais

Participaram do presente estudos seis grupos experimentais conforme descrito na tabela 2.

**Tabela 2:** grupos experimentais

<b>Grupos</b>	<b>Tratamento</b>
Veículo	Salina (solução fisiológica 0,9%) + Salina (solução fisiológica 0,9%)
AVP25	Salina + AVP 25mg/kg/dia
AVP50	Salina + AVP 50mg/kg/dia
Cisplatina	Salina + Cis 5mg/kg/sem
AVP25+cis	Cis 5mg/kg/sem + AVP 25mg/kg/dia
AVP50+cis	Cis 5mg/kg/sem + AVP 50mg/kg/dia

Legenda: Salina (solução fisiológica 0,9%); AVP (ácido valproico); cis (cisplatina 5mg/kg/semana)

Fonte: próprio autor

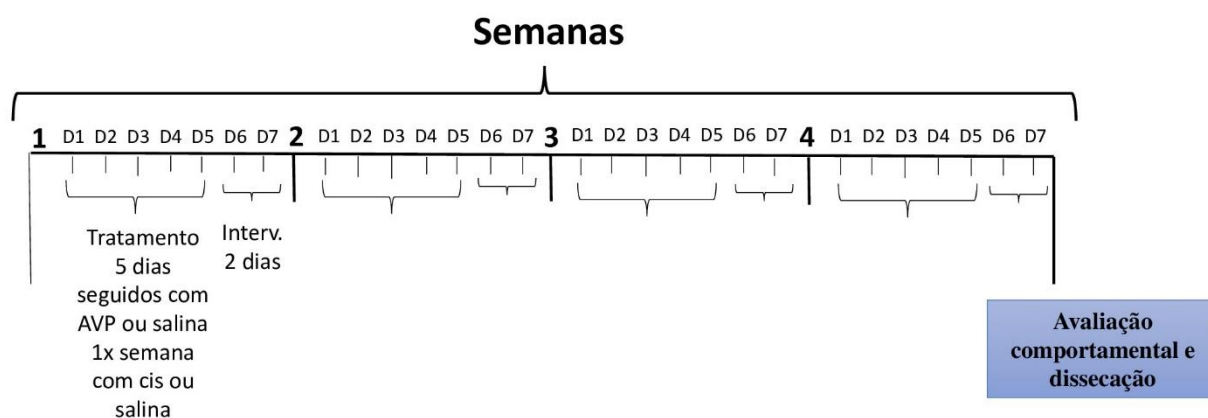
### 4.4 Protocolo de tratamento e delineamento experimental

O protocolo de tratamento foi realizado por quatro semanas da seguinte forma: semanalmente por 5 dias consecutivos e com intervalos de dois dias entre um ciclo e outro de tratamento (figura 4). Primeiramente iniciou-se o pré-tratamento com ácido valproico ou salina dois dias antes (D1 e D2) e duas horas antes do tratamento com cisplatina 5mg/kg/semana (D3), seguido de mais dois dias após a administração de cisplatina (D4 e D5) com posterior intervalo de dois dias (D6 e D7) (figura 4). Após as quatro semanas de tratamento foram realizados os testes comportamentais, a coleta de sangue seguido de eutanásia, dissecação de áreas cerebrais ou anestesia e perfusão

transcardiaca com 0,1 M de tampão de fosfato salina (PBS, pH 7,2), seguido por paraformaldeído a 4% para a preparação para a realização de imunofluorescência.

O tratamento durante quatro semanas consecutivas com cisplatina (5mg/kg/semana) induz os sintomas neurotóxicos por cisplatina no cérebro (LOMELI *et. al*, 2017; CHTOUROU *et. al*, 2015). As doses de ácido valproico foram baseadas em estudos anteriores (XIMENES *et. al*, 2013; XIMENES *et. al*, 2015; CHU *et. al*, 2015) e a via de administração também (LAI *et. al*, 2019; ZIYATDINOVA *et. al*, 2015).

**Figura 4:** Delineamento do protocolo de tratamento realizado



Fonte: próprio autor

#### 4.5 - Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Para análise hematológica e bioquímica através do sangue, os ratos foram submetidos a coleta de amostras de sangue periférico antes de serem eutanasiados. As amostras de sangue foram condicionadas em tubos específicos, sendo distribuídos em dois tubos: um com coagulante e outro sem anticoagulante. Imediatamente após a coleta, alguns frascos foram centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos no local. Partes dessas amostras foram para análise dos parâmetros hematológicos: hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e leucócitos totais e outra parte para análise dos parâmetros hepáticos: AST/TGO e ALT/TGP e renais: ureia e creatinina no soro e dosado no equipamento automatizado BS-120 Mindray, com o uso de reagentes enzimáticos seguindo as recomendações do fabricante (Labtest®). As análises foram realizadas no



Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (LACT – UFC).

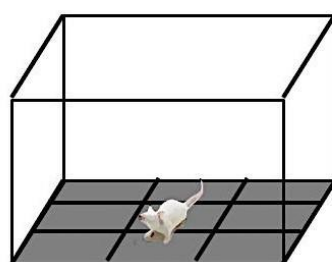
#### 4.6. Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados entre 10 e 16 horas após as 4 semanas de tratamento. Os animais foram transportados para a sala de comportamento nas suas caixas-moradia. Eles permaneceram nessa sala por pelo menos 24 horas antes do início dos testes para ambientação. Durante os testes de comportamento, o ambiente foi mantido com baixa luminosidade.

##### 4.6.1. Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do tratamento com ácido valproico (AVP) em ratos sobre a toxicidade induzida por cisplatina sobre a atividade locomotora e exploratória dos animais (ARCHER, 1973). Os animais foram colocados em um campo aberto, com área 50 x 50cm cercada por paredes de acrílico, com o chão na cor preto dividido em 9 quadrantes iguais (figura 6). Previamente, foram habituados durante 1 minuto ao campo aberto e, posteriormente, submetidos ao teste durante 5 minutos. O parâmetro de observação foi o número de cruzamentos com as quatro patas (“*crossing*”) e atividade de exploração vertical (“*rearing*”) registrados durante o período de 5 minutos.

**Figura 5:** Imagem representativa Teste do Campo Aberto (*Open-field Test*)



1 minuto de habituação  
seguido de 5 minutos de  
avaliação

Fonte: SOUSA, 2019 (adaptado).

#### **4.6.2. Reconhecimento de objeto novo (NOR)**

O reconhecimento do objeto novo é baseado na avaliação das diferenças de tempo de exploração de objetos novos e familiares. Embora parâmetros como atenção e ansiedade também possam ser avaliados por esse teste (GOULART *et al.*, 2010; SILVERS *et al.*, 2007), ele tem sido amplamente utilizado para investigação de alterações na memória, sobretudo no que diz respeito à memória de reconhecimento, e para esse fim será utilizado nesse estudo. Além disso, nos deteremos na avaliação da memória de reconhecimento de curta duração.

Esta tarefa é baseada na tendência inata dos roedores de explorar objetos desconhecidos dentro de seu ambiente. Este teste avalia a capacidade do animal de discriminar entre objetos familiares e novos. O teste consiste em três etapas: habituação, familiarização e a fase teste executadas de acordo com ENNACEUR e DELACOUR *et al.* (1988) e adaptadas por TAGLIALATELA *et al.* (2009), que serão discriminadas a seguir.

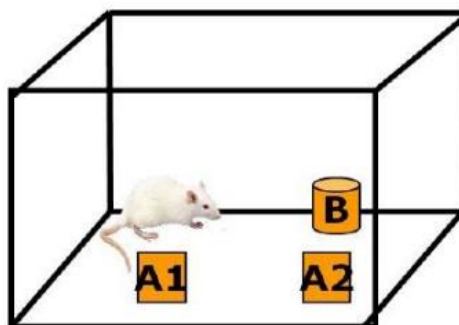
Em primeiro lugar, os camundongos foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico (30 × 30 × 40 cm) por 5 min (figura 7). Após 15 min, os camundongos foram colocados para explorar um conjunto de dois objetos idênticos (A1 e A2) por 5 min que consiste na fase de reconhecimento. Esses objetos eram adequadamente pesados e longos para garantir que os ratos não podiam movê-los nem escalar sobre eles. Após um intervalo de 5 minutos, os animais voltaram para o mesmo local, com a substituição de um objeto familiar por um objeto novo/desconhecido (B), que consiste na fase de teste. Os animais foram autorizados a explorar livremente os objetos novamente por um período de 5 minutos. Um índice de discriminação foi calculado da seguinte fórmula: (tempo explorando novo objeto - tempo explorando objeto familiar) / (tempo explorando novo objeto + tempo explorando objeto familiar) (DIX; AGGLETON, 1999).

#### **Quadro 1: índice de discriminação do objeto**

(Tempo explorando o objeto específico/ tempo total usado na fase teste)

Fonte: próprio autor

**Figura 6-** Desenho representativo do aparato do teste NOR



**Fonte:** IZQUIERDO, 2006

#### **4.6.3. Labirinto em Y (Y-maze)**

O labirinto em Y foi realizado com o objetivo avaliar os efeitos do tratamento com ácido valproico em ratos sobre a neurotoxicidade induzida por cisplatina sobre memória de trabalho (“*working memory*”) e aprendizado, sendo conduzido conforme descrito previamente (YAMADA et al., 1996). O labirinto em Y é constituído de três braços idênticos (75,5 cm de comprimento, 34,5 cm de altura e 11,7 cm de largura), dispostos a 120° um do outro, formando um triângulo central (Figura 8). Os animais foram colocados em um dos braços e a sequência das entradas nos braços foi registrada durante oito minutos.

A alternância foi definida como a entrada nos três braços, em qualquer ordem, sem que houvesse repetição dos braços (por exemplo, 123, 321, 231). O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (STONE et al., 1991). Após o teste, os animais foram devolvidos às suas caixas-moradia e realizado a assepsia do labirinto em Y com álcool etílico a 15% entre um animal e outro. Assim, a percentagem das alterações foi calculada como a razão entre as alterações corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100 (STONE et al., 1991).

**Quadro 2:** cálculo de percentual de alternâncias corretas

$$\% \text{ de alternâncias espontâneas} = n / n-2 \times 100$$

Fonte: próprio autor

**Figura 7:** desenho representativo do aparato do teste Labirinto em Y



Fonte: STONE, et. al, 1991

#### 4.7 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

Os testes para avaliação do estresse oxidativo foram o da determinação de Nitrito, dos Níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e de Glutathiona Reduzida (GSH), visando aferir nas áreas cerebrais córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos ao protocolo de tratamento.

##### 4.7.1 Preparação de tecido

As amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas (10 vezes (p/v) arrefecidas com gelo, com 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 15 minutos, e alíquotas dos sobrenadantes foram separados e usados para a determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

#### ***4.7.2 Determinação do conteúdo de nitrito em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.***

Áreas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) foram utilizadas para a determinação das concentrações de nitrito. O reagente Griess foi adicionado a uma placa de 96 poços junto com os sobrenadantes dos homogenatos. A absorbância foi medida utilizando-se um leitor de microplacas a 560 nm. Além disso, as mesmas áreas cerebrais dos animais tratados apenas com veículo foram analisadas (grupo de nível basal). Anteriormente, foi gerada uma curva padrão para nitrito, utilizando concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 nmol/mL (GREEN; GOLDMAN, 1981; RADENOVIC; SELAKOVIC, 2005).

#### ***4.7.3 Determinação de peroxidação lipídica (substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico, TBARS) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.***

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos homogenatos. As amostras foram homogenizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4 e 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas novamente centrifugadas (7000 rpm/15 min). Logo em seguida, 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturados a 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, sendo aquecidos em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorbância a 535 nm e expressa como µg de MDA/g de tecido úmido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

#### ***4.7.4 Determinação da concentração cerebral de glutatona reduzida (GSH) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.***

A determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH) foi avaliada para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. As áreas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) foram diluídas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% w / v) e adicionadas a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (3000 rpm/15 min), o sobrenadante do homogeneizado foi recolhido e os níveis de GSH foram determinados (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Resumidamente, as amostras foram misturadas com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB. Níveis de GSH

foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, calculada com base numa curva padrão de glutatona e expressos como ng de GSH/g de tecido úmido.

#### **4.8 Determinação da atividade de Acetilcolinesterase (AChE)**

O ensaio para medir a atividade da AChE foi modificado a partir do ensaio descrito por Ellman et al., (1961). Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em tampão fosfato pH 7.4. A concentração de proteínas foi determinada pelo método Bradford, usando como padrão o BSA, a concentração foi ajustada para 0,5 mg/mL de proteínas totais. Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 34  $\mu$ L de homogenato (0,5 mg/mL), 134 $\mu$ L de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,75 mM. Em seguida, a absorbância foi registrada a 412 nm por 1 min e logo após 34  $\mu$ L de iodeto de acetiotiocolina (ACTI) 9 mM (substrato) foi adicionado, e absorbância foi registrada novamente por 5 min a 412nm. Foi realizada a leitura antes da adição do ACTI (BRANCO), a fim de normalizar dos valores na análise dos dados, pois o DTNB é amarelo, e tem uma cor mesmo antes do ACTI ser adicionado.

Cálculo da atividade da AChE

$$A = c \cdot \epsilon \cdot d$$

Onde,

– A = absorbância (D.O.)

– c = concentração

–  $\epsilon$  = coeficiente de extinção molar (1,36. 10<sup>4</sup> mmol<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>)

– d = caminho óptico (0,642 cm) tamanho do poço da placa, se for cubeta é 1cm

#### **4.9 Imunofluorescência para caspase 3 e BCL 2**

Os animais de cada grupo foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg) e perfundidos transcardiacamente com 0,1 M de tampão de fosfato salina (PBS, pH 7,2), seguido por paraformaldeído a 4%. Os cérebros foram removidos e pós-fixados em 4% de paraformaldeído por 2 h e crioprotetidos por incubação em 30% sucrose/0,1 M de tampão fosfato. Uma vez retirados desta solução, os cérebros foram embebidos em Tissue-Tek (SakuraAméricas, EUA), congeladas a - 70°C.

Os cérebros foram cortados em seções coronais de 10  $\mu$ m, utilizando um Criostato CM1850 para cortes em congelamento e acessórios da marca Leica Mikrosystem. As fatias de todo o hipocampo foram recolhidas em série e armazenadas em placas de

imunohistoquímica de 24 poços, na forma de secções flutuantes imersas em PBS com 0,01% de NaN<sub>3</sub> (azida de sódio, em pó a partir de SigmaAldrich™, EUA), sendo posteriormente lavadas novamente em PBS, fixadas e montadas em lâminas silanizadas. Os cortes por sua vez passaram pelo processo de recuperação antigênica, sendo posteriormente realizada a imunomarcção de acordo com protocolo padrão, onde secções cerebrais foram incubadas com anticorpo anti-Iba1 (1:100, Wako, coelho) e anticorpo anti-GFAP (1:200, Abcam, camundongo) diluídos em PBS com albumina sérica bovina a 5% (HARRISON et al., 2007).

Os cortes permaneceram incubados em cada anticorpo por 12 horas a 4°C, sendo subsequentemente incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho IgG-Alexa-594 (Invitrogen, USA) e anti-camundongo IgG-Alexa-488, diluído na proporção de 1:400 em PBS com albumina sérica bovina a 5% (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) por 2 horas em temperatura ambiente (25°C) (AHMED et al., 2007). Por fim os cortes foram marcados com 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI) (SigmaAldrich, USA) por 20 minutos segundo orientações do fabricante, para marcação nuclear. As lâminas foram então montadas com solução anti-desbotamento ProlongGold (Invitrogen, USA) e fotografadas, na magnificância de 10x e de 20x em leitor de lâminas Cytation 3 ImageReader (Biotek Instruments). A análise das imagens foi realizada com o Software Fiji ImageJ® versão para Windows, sendo feita a quantificação de intensidade de fluorescência e número de células marcadas por fatia cerebral nas regiões CA1, CA2, CA3 e GD.

#### ***4.10.1 Isolamento Mitocondrial do cérebro***

Para esse teste foram utilizados ratos adultos da linhagem wistar (CEUA 88/17). As mitocôndrias foram isoladas usando um macerador de tecido e digitonina para liberar mitocôndrias de sinaptosomos. Este procedimento resulta em uma mistura de mitocôndrias sinaptosômicas e não-sinaptosômicas. Resumidamente, os cérebros de ratos foram finamente picados e lavados em 4 graus Celsius em um tampão contendo 125mM de sacarose, 250mM mannitol, 10mM Hepes, 10mM EGTA, 0,01% BSA (pH 7.2, KOH) e então foi transferido para um macerador de tecido de vidro e homogeneizado. Após isso foi então centrifugado a 2000 x g por 3 minutos para remover células e núcleos ininterruptos. O sobrenadante foi transferido para um tubo frio e centrifugado duas vezes a 12.000 g por 8 min. A segunda centrifugação foi realizada na presença de 0,1 % de

digitonina. O “pellet” mitocondrial resultante foi ressuspenso em um tampão desprovido de EGTA. A solução mitocondrial foi exposta à cisplatina (10 ng/L) e à cisplatina (10 ng/L) com ácido valproico (10, 50 e 100 ng/L) por um minuto e, em seguida, o protocolo de intumescimento mitocondrial prosseguiu. A concentração de proteína mitocondrial foi determinada espectrofotometricamente, de acordo com Bradford (Bradford 1976), com BSA como padrão.

#### ***4.10.2 Intumescimento mitocondrial do cérebro***

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na sobrevivência celular, e o intumescimento celular é o principal fator que causa apoptose mediada por mitocôndrias ou necrose de morte celular. Em resposta ao estresse oxidativo, as mitocôndrias sofrem a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP), na membrana interna. A abertura sustentada do PTP desencadeia o inchaço da mitocôndria, devido à desregulação e sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (LEMASTERS et al., 2009, CHAPA-DUBOCQ et al., 2018).

As mudanças na dispersão de luz devidas à absorção do cálcio e consequente inchaço da mitocôndria, foram medidas como uma diminuição da densidade óptica em 540 nm. As mitocôndrias cerebrais de rato foram incubadas em tampão contendo 150 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM succinato, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1  $\mu\text{g/mL}$  oligomicina, pH 7.2 (KOH). Para induzir a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, foram adicionados 2  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . A diminuição da dispersão de luz foi registrada por 5 minutos.

#### ***4.10.3 Consumo de oxigênio mitocondrial no cérebro***

As mitocôndrias requerem oxigênio para produzir ATP em quantidades suficientes para impulsionar reações que requerem energia em organismos eucarióticos. A medição das taxas de consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas *in vitro* é uma técnica útil e valiosa na pesquisa e avaliação de disfunção e doença mitocondrial, uma vez que o consumo de oxigênio dependente de ADP reflete diretamente a respiração acoplada ou fosforilação oxidativa (Li & Graham, 2012). A taxa de consumo de oxigênio mitocondrial foi medida, usando um eletrodo de oxigênio do tipo Clark conectado a um sistema de aquisição de dados de computador (Oxygraph-Hansatech, Reino Unido). As mitocôndrias foram ressuspenso em um tampão de respiração, contendo manitol 75 mM, sacarose 25 mM, KCl 100 mM, Tris-HCl 20 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM e BSA livre de ácido



graxo 1 mg / ml, pH 7,2. Glutamato (5 mM) mais malato (2,5 mM) ou succinato (10 mM) foram usados como substrato para o complexo I e II, respectivamente. Em seguida, o estado 3 foi induzido pela adição de 500  $\mu$ M de ADP. Para induzir o estado 4, adicionamos 1  $\mu$ g / ml de oligomicina.

#### ***4.10.4 Razão de controle respiratório mitocondrial cerebral (RCR)***

A eficiência mitocondrial representa a capacidade do animal de converter seus recursos em ATP. Pode ser calculado como a razão de controle respiratório, RCR (razão da respiração mitocondrial que apóia a síntese de ATP para aquela necessária para compensar o vazamento de prótons) ou como a quantidade de ATP gerada por unidade de oxigênio consumido, razão ATP / O (SALIN et al., 2018). As taxas de respiração (RCR) foram calculadas como o tempo negativo derivado da concentração de oxigênio para os estados 3 e 4. A Respiratory Control Ratio (RCR) foi calculada como a razão do estado 3 (induzido por ADP) / estado 4 (induzido por oligomicina).

#### **4.11 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas pelo Software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc.) e todos os dados expressos como média  $\pm$  EPM (erro padrão médio). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade D'Agostino e Pearson para verificar se dados apresentam distribuição normal, sendo determinado o uso de testes paramétricos para a avaliação estatística dos resultados. Nos resultados que apresentaram uma distribuição normal, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey como teste post-hoc, para comparações dentro dos grupos. Para comparações entre dois grupos, utilizou-se o teste t de Student. Para a análise das curvas de sobrevida foi utilizado a curva de sobrevida de Kaplan-Meier, mortalidade foi utilizado através de "Mantel-Cox test". Em todos os testes o critério de significância utilizado foi de  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Após a coleta de sangue periférico foi avaliado alguns parâmetros hematológicos, bioquímicos (hepáticos e renais), objetivando avaliar os efeitos do tratamento com AVP nas doses de 25 e 50mg/kg em animais submetidos ao modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.

#### *5.1.1 Efeito do Ácido Valproico sobre parâmetros hematológicos em ratos submetidos ao modelo toxicidade induzida por cisplatina.*

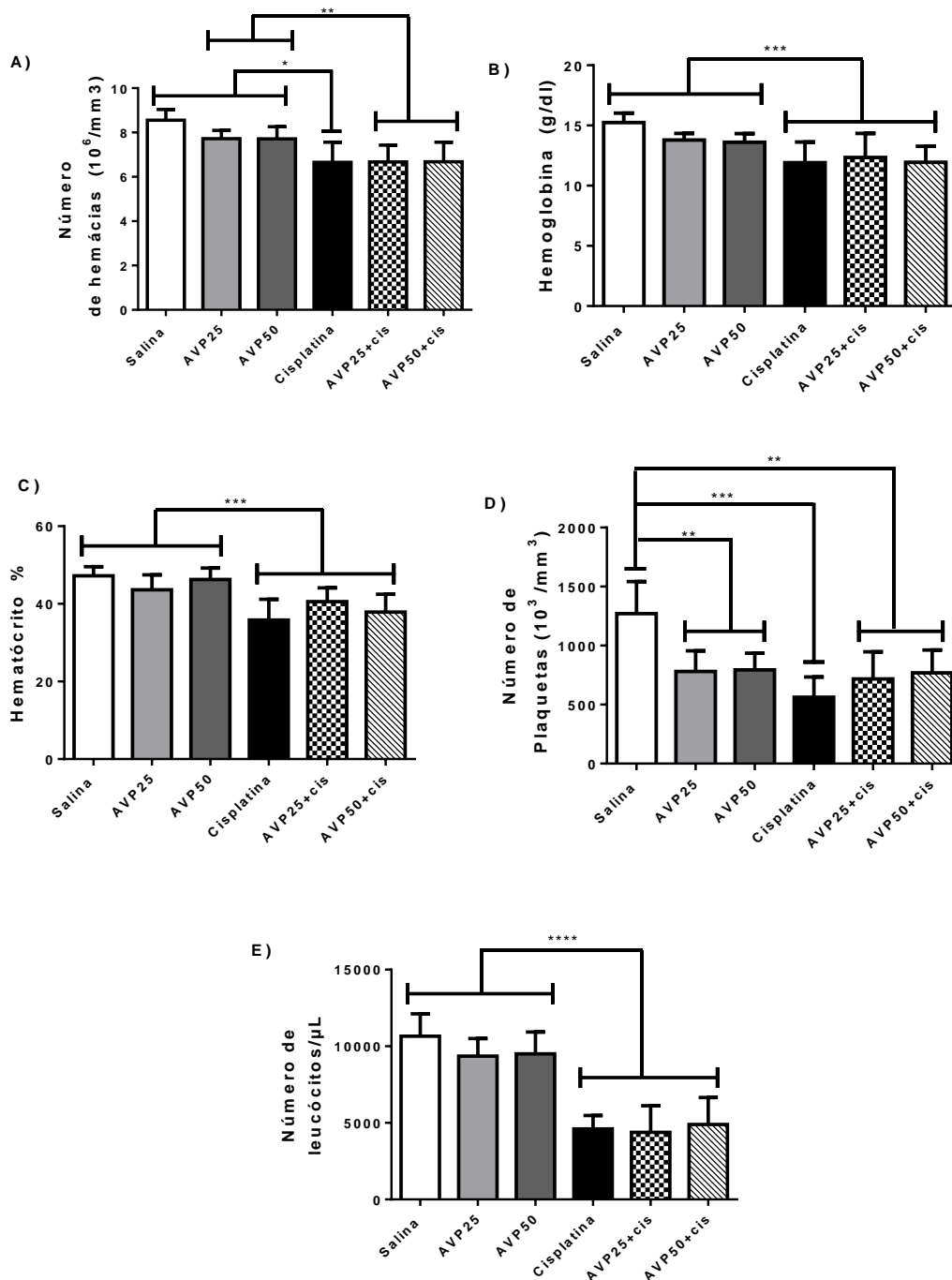
Ao realizar a avaliação dos parâmetros hematológicos observou-se que no número de hemácias (fig 9A) houve redução significativa nos grupos: cisplatina, AVP25+cis e AVP50+cis em relação ao grupo salina [F (5, 43) = 10,49;  $p < 0.0001$ ].

Em relação ao valor de hemoglobina (fig 9B) [F (5, 40) = 7,8717] e o hematócrito (fig 9C) [F (5, 44) = 11,85693], houve redução significativa nos grupos cisplatina e, AVP25+cis e AVP50+cis em relação aos grupos veículo; AVP25 e AVP50 ( $p < 0.0001$ ).

Já na contagem de plaquetas (Fig 9D), houve redução significativa em todos os grupos quando comparados ao grupo veículo. Porém, o maior nível de significância em relação veículo foi no grupo cisplatina em relação ao grupo veículo [F (5, 33) = 9,325 e  $p < 0.001$ ].

A análise dos dados da quantificação de leucócitos totais (Fig. 9E) houve redução significativa em todos os grupos que receberam tratamento com cisplatina(5mg/kg/semana) [F (5, 41) = 32,41; ( $p < 0.0001$ )] em relação aos grupos não tratados com cisplatina.

**Figura 8:** Valores dos parâmetros hematológicos: hemácias (Fig.9A), hematócrito (Fig.9B), hemoglobina (Fig.9C), contagem de plaquetas (Fig.9D) e leucócitos (Fig.9E) em ratos submetidos ao modelo toxicidade induzida por cisplatina.



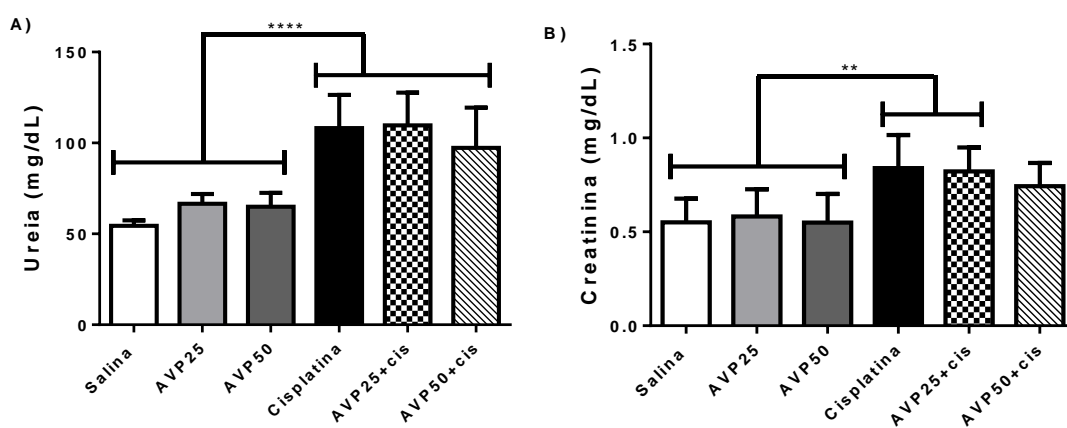
Os animais (n = 7-8 animais/grupo). A) número de hemácias; B) hemoglobina; C) hematócrito; D) número de plaquetas; E) número de leucócitos. Os valores estão representados como média ± EPM. A análise dos resultados foi feita através de one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. [\*\*\*p<0.0001; \*\*p<0.0001; \*\*p<0.001; \*p<0,05].

### 5.1.2 Efeito do Ácido Valproico sobre parâmetros renais bioquímicos de ratos submetidos ao modelo neurotoxicidade induzida por cisplatina.

Na análise dos parâmetros renais, em relação a concentração de ureia (fig. 10A) houve aumento significativo em todos os grupos que receberam tratamento com cisplatina (5mg/kg/semana) em relação aos grupos não tratados com cisplatina [F (5, 41) = 32,41 e (p<0.001)].

Já na concentração de creatinina (fig. 10B), houve aumento significativo apenas nos grupos: cisplatina e AVP25+cis em relação aos grupos não tratados com cisplatina [F (5, 47) = 8,044 e p<0.01].

**Figura 9:** Valores dos parâmetros renais bioquímicos: as ureia (Fig.10A) e creatinina (Fig.10B) em ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.



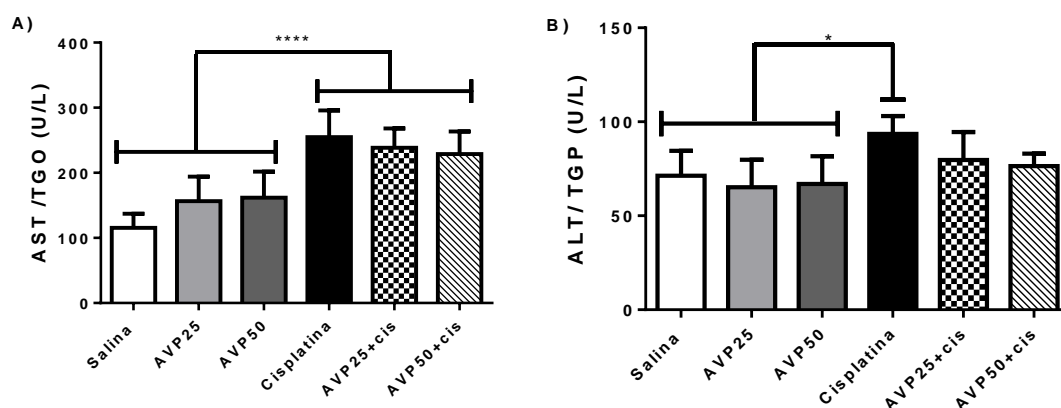
Os animais (n = 7-8 animais/grupo). A) uréia e B) creatinina. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. A análise dos resultados foi feita através de one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. [\*\*\*\*p<0.0001; \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01; \* p< 0,5].

### 5.1.3 Efeito do Ácido Valproico sobre parâmetros bioquímicos hepáticos em ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.

Na avaliação dos parâmetros hepáticos houve um aumento significativo dos níveis de aspartato aminotransferase (AST/TGO) (fig 11A) em todos os grupos que receberam tratamento com cisplatina: cisplatina; AVP25+cis e AVP50+cis, quando comparado aos grupos veículo; AVP25 e AVP50 [ $F(5, 40) = 18,40$  e ( $p < 0.0001$ )].

Na análise da alanina aminotransferase (ALT/TGP) o aumento significativo dessa enzima ocorreu apenas no grupo cisplatina quando comparado com os grupos: veículo AVP25 e AVP50 [ $F(5, 40) = 5,242$ ; ( $p < 0,5$ )].

**Figura 10:** Valores dos parâmetros hepáticos bioquímicos: transaminase oxalacética (AST/TGO) (Fig.11A) e transaminase pirúvica (ALT/TGP) (Fig 11B) em ratos submetidos ao modelo toxicidade induzida por cisplatina.



Os animais ( $n = 8 - 10$  animais/grupo). A) transaminase oxalacética (AST/TGO) e B) transaminase pirúvica (ALT/TGP). Os parâmetros hematológicos foram... Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. A análise dos resultados foi feita através de one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. [\*\*\*\* $p < 0.0001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*  $p < 0,5$ ].

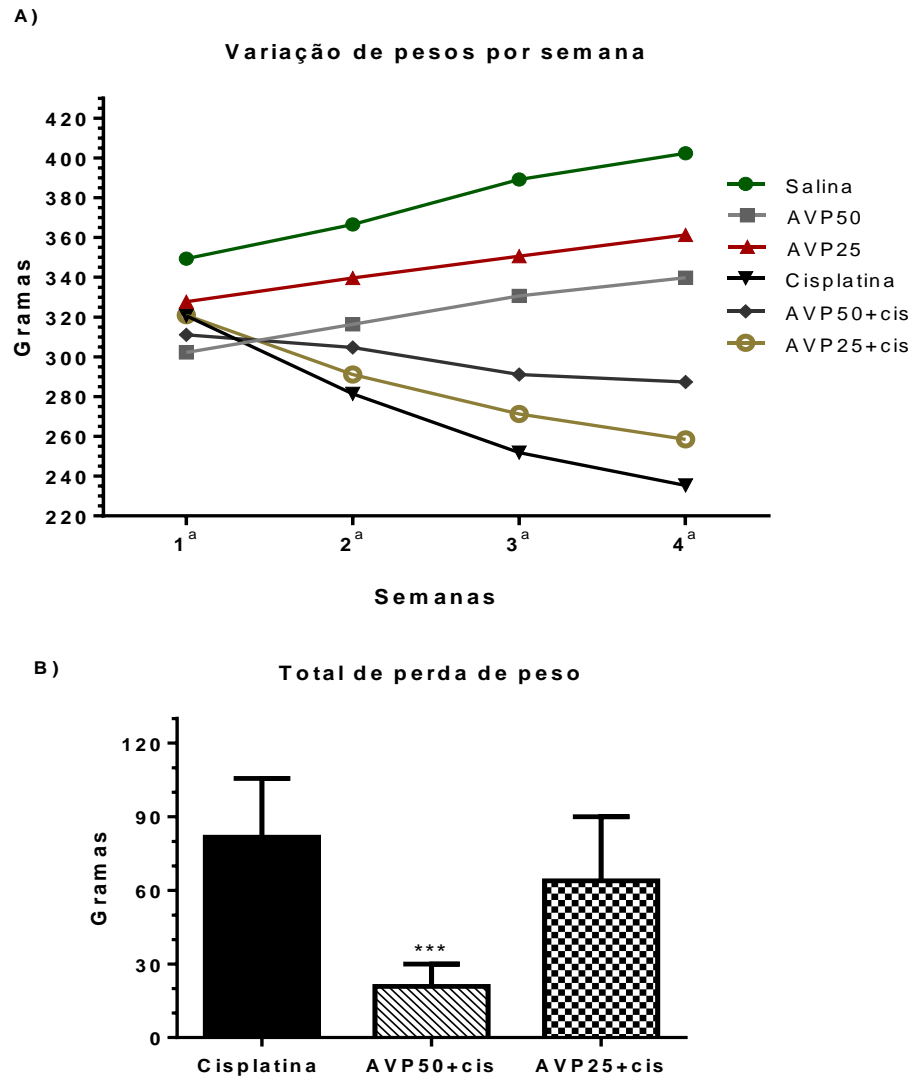
## **5.2 – Avaliação do Efeito do Ácido valpróico sobre o peso de ratos durante o período de submissão ao modelo neurotoxicidade induzida por cisplatina.**

Antes e durante a realização do protocolo experimental foi realizado semanalmente, a pesagem dos animais para calcular a quantidade adequada de cisplatina e de AVP a ser administrada nos animais, como também, avaliar o efeito do tratamento com cisplatina e da cisplatina associado com AVP sobre o peso dos animais semanalmente (Fig 12).

Foi observado que durante as quatro semanas de protocolo experimental a curva de peso dos grupos de animais que não foram tratados com cisplatina: salina, AVP50 e AVP25 manteve-se ascendente devido ao ganho peso. Entretanto, os grupos que foram tratados com cisplatina mantiveram curva descendente, principalmente o grupo que foi tratado somente com cisplatina (5mg/kg/sem) + salina (FIG. 12A), que foi o grupo no qual os animais perderam mais peso, inclusive, de forma constante a partir da primeira semana até o final do tratamento (última semana).

Ao analisar o total de perda de peso desses grupos, foi observado que o grupo AVP50+cis foi o que perdeu menos peso, ao se comparar com o grupo cisplatina, portanto, demonstrando que houve uma redução significativa da perda de peso nesse grupo e que provavelmente o AVP na dosagem 50mg/kg/dia ajudou no controle da perda de peso desses animais [ $P < 0,001$ ;  $F(2, 25) = 21,73$ ].

**Figura 11:** Efeito do ácido valproico sobre o peso de ratos durante o período de submissão ao modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.



(A) curva de evolução dos pesos dos animais antes e durante o protocolo de tratamento. (B) total de perda de peso durante o protocolo de tratamento nos grupos que perderam peso. Análise dos resultados foi feita através de ANOVA, seguida do teste de tukey's. As barras dos gráficos representam a média  $\pm$  E.P.M, n= 9 a 10 animais por grupo. Foi realizado o teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov test. \*\*\*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,0001$ .

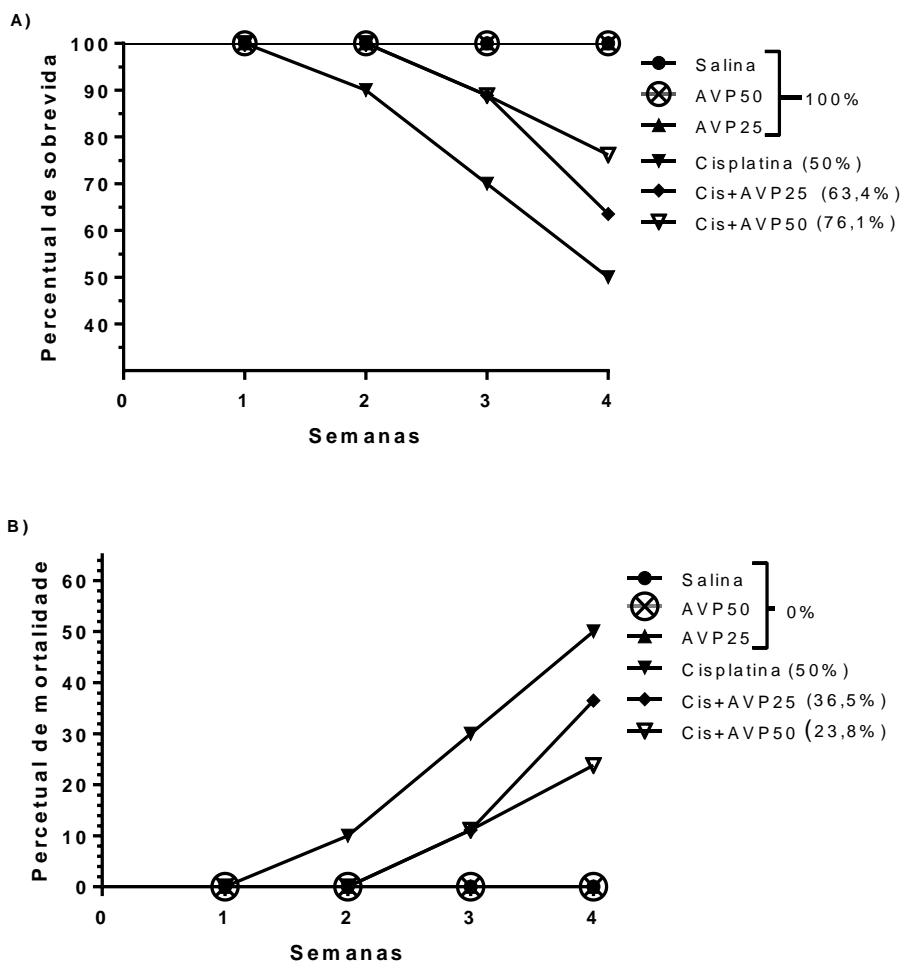
### **5.3 – Avaliação do efeito do Ácido Valproico sobre o percentual de sobrevivência e de mortalidade de ratos durante o período de submissão ao modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.**

Devido aos efeitos tóxicos da cisplatina, diariamente o estado de saúde dos animais eram avaliados durante a realização do protocolo experimental. Ocorreu mortalidade de alguns animais nos grupos experimentais que receberam tratamento com cisplatina (5mg/kg/sem), portanto, não conseguindo chegar até o final do protocolo. Foi realizado então, uma avaliação do percentual de sobrevivência e de mortalidade dos grupos experimentais (FIG 13 A e B).

Ao realizar a análise foi encontrado um maior percentual de mortalidade (50%) e menor percentual de sobrevivência (50%) no grupo tratado com cisplatina+salina (cisplatina), seguindo do grupo tratado com cisplatina + AVP 25mg/kg (cis+AVP25) com um percentual de sobrevivência de 63,4% e de mortalidade de 36,5% e o do grupo com menor percentual de mortalidade (23,8%) e maior percentual de sobrevivência (76,1%) que foi o grupo tratado com cisplatina + ácido valproico 50mg/kg (cis+AVP50).



**Figura 13** - Percentual de sobrevivência e de mortalidade de ratos durante o período de submissão ao modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.



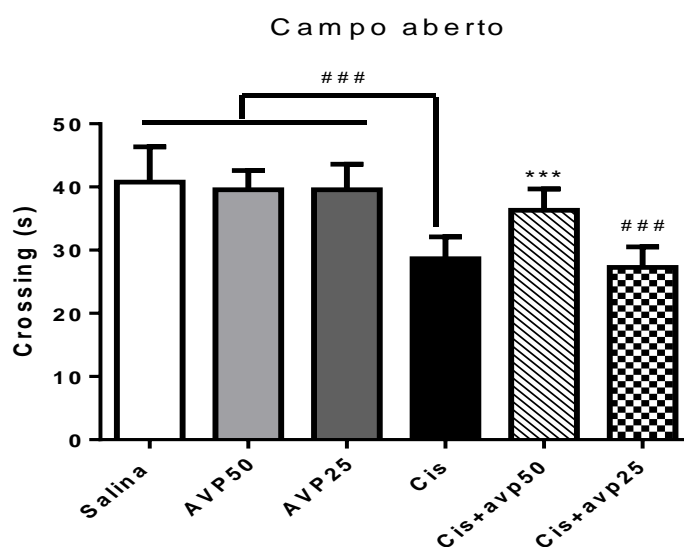
(A) curva de percentual de sobrevivência dos animais durante o protocolo de tratamento. (B) curva percentual de mortalidade dos animais durante o protocolo de tratamento. Análise dos resultados foi feita através de Mantel-Cox test. As barras dos gráficos representam a média  $\pm$  E.P.M, n= 9 a 10 animais por grupo.

## 5.4 Testes Comportamentais

### 5.4.1 Efeito do Ácido Valproico sobre a atividade locomotora no teste de Campo Aberto em ratos submetidos a modelo de neurotoxicidade induzida por cisplatina.

Os resultados foram obtidos no teste do campo aberto em relação ao número de cruzamentos “crossings” (fig 14) e a atividade exploratória através do número de “rearings” (fig 15) avaliados por 5 minutos, após 4 semanas de tratamento.

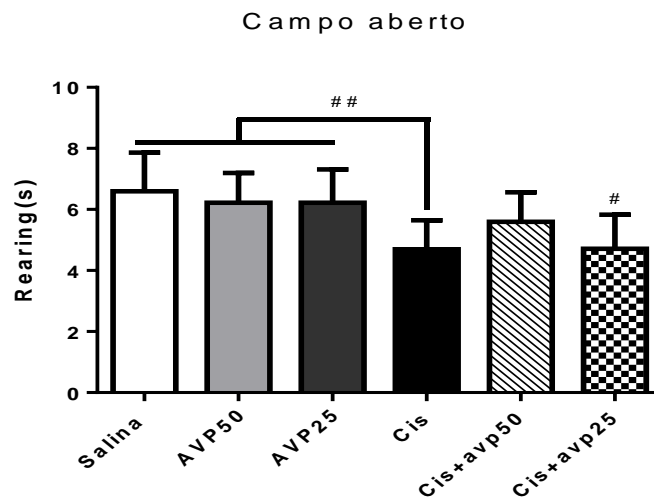
**Figura 13** – Número de cruzamentos (“crossing”) no campo aberto em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.



Os animais (n = 8 - 10 animais/grupo) foram tratados com salina (veículo) ou ácido valpróico (25 e 50, mg/kg i.p.) + salina: AVP 50 e AVP 25) ou cisplatina (5mg/kg/semanal i.p.) + salina (grupo CIS) ou cisplatina (5mg/kg/semanal i.p.) + ácido valpróico (25 e 50, mg/kg i.p.): grupos Cis+avp50 e cis+avp25 durante 4 semanas. Os valores estão representados como média ± EPM. A análise dos resultados foi feita através de one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Foi realizado o teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov test. \*\*\*\*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ ; ##### diferente em relação ao veículo  $p < 0,0001$ ; ##  $p < 0,01$  e #  $p < 0,05$ .

Em relação ao número de cruzamentos “crossing”, houve redução significativa no grupo cisplatina e no grupo AVP25+cis em relação aos grupos não tratados com cisplatina ( $p < 0,0001$ ). Já no grupo AVP50+cis não houve diferença significativa do número de “crossings” em relação aos grupos que não foram tratados com cisplatina, mas, houve também um aumento significativo de “crossings” ( $p < 0,01$ ) em relação aos animais do grupo cisplatina [ $F(5, 50) = 21,44$  e  $P = 0,5030$ ].

**Figura 14 – Atividade exploratória (“rearing”) no campo aberto em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.**

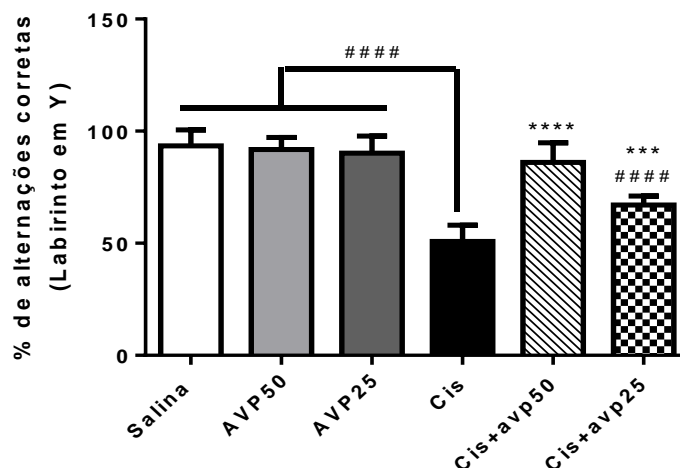


Os animais (n = 8 - 10 animais/grupo) foram tratados com salina (veículo) ou ácido valpróico (25 e 50, mg/kg i.p.) + salina: AVP 50 e AVP 25) ou cisplatina (5mg/kg/semanal i.p.) + salina (grupo CIS) ou cisplatina (5mg/kg/semanal i.p.) + ácido valpróico (25 e 50, mg/kg i.p.): grupos Cis+avp50 e cis+avp25 durante 4 semanas. Os valores estão representados como média ± EPM. A análise dos resultados foi feita através de one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Foi realizado o teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov test. \*\*\*\*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ ; #### diferente em relação ao veículo  $p < 0,0001$ ; ##  $p < 0,01$  e #  $p < 0,05$ .

Na análise do número de “rearings” houve também redução significativa no grupo cisplatina ( $p < 0,01$ ) e no grupo AVP25+cis ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos não tratados com cisplatina. Da mesma forma, no grupo AVP50+cis não ocorreu alteração significativa de “rearings” relação aos grupos não tratados com cisplatina, mas um aumento significativo em relação ao grupo cisplatina [ $F(5, 49) = 5,286$  e  $P = 0,8781$ ]; ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.2 Efeito do Ácido Valproico sobre o desempenho no teste labirinto em Y (Y maze) em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.

**Figura 15** – Desempenho no teste labirinto em Y (Y maze) em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.



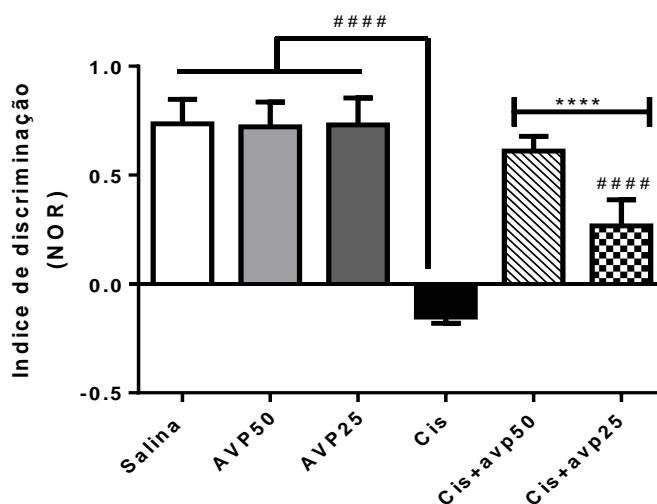
Os animais (n = 8 - 10 animais/grupo) foram tratados com salina (veículo) ou ácido valpróico (25 e 50, mg/kg i.p.) + salina AVP 50 e AVP 25) ou cisplatina (5mg/kg/semanal i.p.) + salina (CIS) ou cisplatina + ácido valpróico (25 e 50, mg/kg i.p.) durante 4 semanas. Percentual de alterações corretas avaliados por 8 minutos, após 4 semanas de tratamento. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. A análise dos resultados foi feita através de one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Foi realizado o teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov test. \*\*\*\*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ ; ##### diferente em relação ao veículo  $p < 0,0001$ ; ##  $p < 0,01$  e #  $p < 0,05$ .

A análise dos dados do teste labirinto em Y (Y maze) mostrou que houve uma redução significativa no percentual de alterações corretas nos grupos cisplatina e AVP25+cis em relação aos grupos veículo; AVP25 e AVP50 ( $p < 0.0001$ ).

Porém o grupo AVP50+cis obteve um maior percentual de alterações corretas de forma significativa em relação ao grupo cisplatina ( $p < 0.0001$ ) e não obteve diferença significativa em relação aos grupos não tratados com cisplatina. Já no grupo AVP25+cis o percentual de alterações corretas foi significativamente maior que o grupo cisplatina ( $p < 0.001$ ), mas foi significativamente menor em relação aos grupos não tratados com cisplatina [ $p < 0.0001$ ];  $F(5, 50) = 55,73$ ].

### 5.4.3 Efeito do Ácido Valproico sobre o desempenho no teste de reconhecimento do objeto novo (NOR) em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.

**Figura 16-** Desempenho no teste de reconhecimento do objeto novo (NOR) em ratos submetidos a toxicidade induzida por cisplatina.



Os animais ( $n = 8 - 10$  animais/grupo) foram tratados com salina (veículo) ou ácido valproico (25 e 50, mg/kg i.p.) + salina AVP 50 e AVP 25) ou cisplatina (5mg/kg/semanal i.p.) + salina (CIS) ou cisplatina + ácido valproico (25 e 50, mg/kg i.p.) durante 4 semanas. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. A análise dos resultados foi feita através de one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. [\*\*\*\* $p < 0.0001$  veículo, AVP50 e AVP 25 vs Cis; \*\*\*\* $p < 0.0001$  veículo, AVP50 e AVP 25 vs Cis + AVP25 + Cis; \*\*\*\* $p < 0.0001$  Cis vs Cis+AVP50; \*\*\*\* $p < 0.001$  Cis vs Cis+AVP25.

O índice de discriminação do objeto novo foi registrado por 10 min no campo aberto, após 4 semanas de tratamento, para análise da memória de curto prazo (fig. 17). Os animais do grupo cisplatina exibiram desempenho significativamente prejudicado do índice de discriminação em relação aos grupos: veículo; AVP25 e AVP50 ( $p < 0.0001$ ), que são os grupos que não foram tratados com cisplatina.

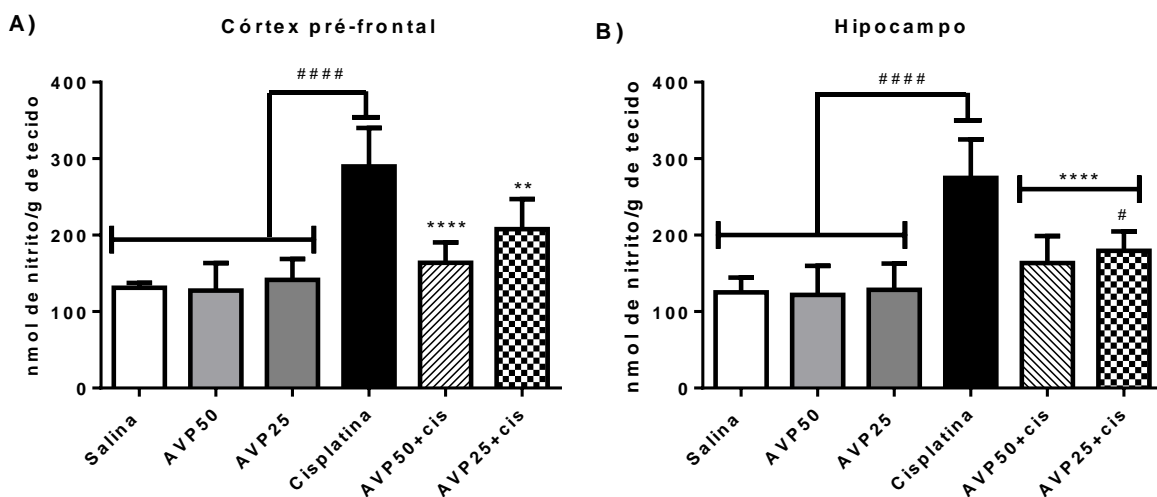
Em relação ao grupo AVP50+cis não houve diferença significativa do índice de discriminação em relação aos grupos que não foram tratados com cisplatina. Mas, foi encontrado também um aumento significativo do desempenho ( $p < 0.0001$ ) em relação aos animais do grupo cisplatina.

Já no grupo AVP25+cis, o índice de discriminação foi significativamente maior quando comparado com o grupo cisplatina ( $p < 0.0001$ ), mas significativamente menor ( $p < 0.0001$ ) que os grupos que não foram tratados com cisplatina [ $F(5, 48) = 107,2$ ].

## 5.5 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

### 5.5.1 Determinação do conteúdo de nitrito em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.

**Figura 17-** Efeito do ácido valpróico sobre o conteúdo de nitrito no hipocampo e córtex pré-frontal de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



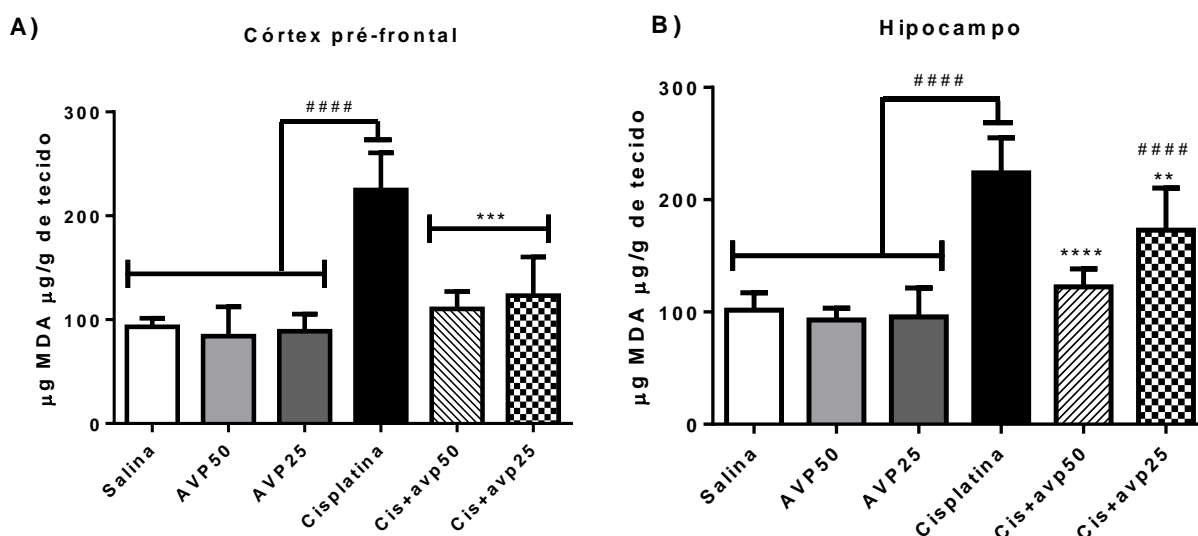
Os dados são expressos como nmol de nitrito/g de tecido. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA, seguida do teste de tukey's. As barras dos gráficos representam a média  $\pm$  E.P.M,  $n = 6 - 8$  animais por grupo. Foi realizado o teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov test. \*\*\*\*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ ; ##### diferente em relação ao veículo  $p < 0,0001$ ; ##  $p < 0,01$  e #  $p < 0,05$ .

Na análise do efeito do AVP sobre o conteúdo de nitrito no córtex pré-frontal houve aumento significativo no grupo cisplatina quando comparado com os grupos: veículo, AVP25 e AVP50 ( $p < 0,0001$ ). Já nos grupos AVP25+cis ( $p < 0,01$ ) e AVP50+cis ( $p < 0,0001$ ), houve uma redução significativa sobre o conteúdo de nitrito em relação ao grupo cisplatina [ $F(5, 42) = 27,54$ ].

Em relação ao hipocampo também houve aumento significativo no grupo cisplatina quando comparado com os grupos: veículo, AVP25 e AVP50 ( $p < 0,0001$ ) e redução significativa nos grupos AVP25+cis e AVP50+cis em relação ao grupo cisplatina ( $p < 0,0001$ ), porém, o grupo AVP25+cis houve aumento significativo ( $<0,05$ ) em relação aos grupos veículo, AVP25 e AVP50 [ $F(5, 45) = 22,72$ ].

### 5.5.2 Determinação de peroxidação lipídica (substâncias reativas de ácido tiobarbitúico, TBARS) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.

**Figura 18-** Efeito do ácido valpróico sobre a peroxidação lipídica (substâncias reativas de ácido tiobarbitúico, TBARS) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.



Efeito do ácido valpróico sobre a peroxidação lipídica (substâncias reativas de ácido tiobarbitúico, TBARS) no hipocampo e córtex pré-frontal de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina (5mg/kg/sem). Os dados são expressos como µg/g de tecido. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA, seguida do teste de tukey's. As barras dos gráficos representam a média  $\pm$  E.P.M,  $n = 6 - 8$  animais por grupo. Foi realizado o teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov test. \*\*\*\*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ ; ##### diferente em relação ao veículo  $p < 0,0001$  e ## diferente em relação ao controle ( $p < 0,01$ ).

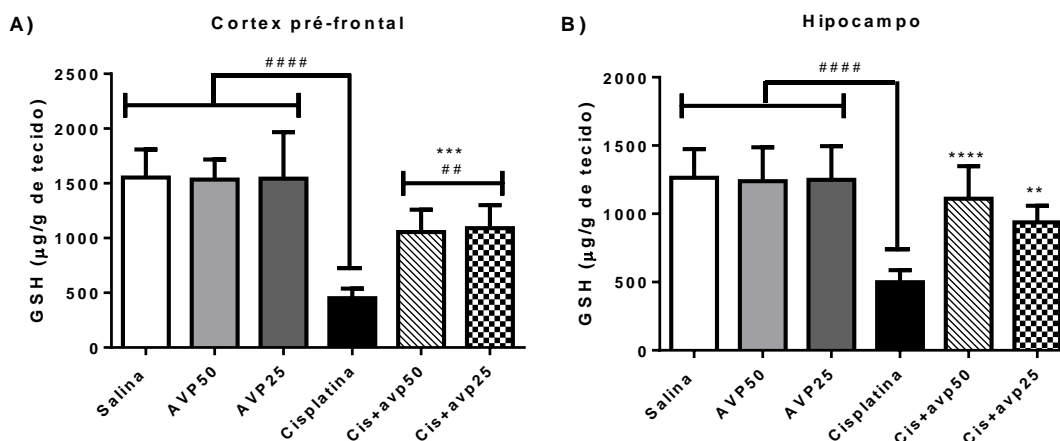
Ao analisar o efeito do AVP sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal foi encontrado um aumento significativo no grupo cisplatina ao ser comparado com os grupos: veículo, AVP25 e AVP50 ( $p < 0,0001$ ). Houve também uma redução significativa

nos grupos AVP25+cis ( $p < 0,01$ ) e AVP50+cis ( $p < 0,0001$ ), em relação ao grupo cisplatina. [F (5, 41) = 31,97].

No hipocampo também foi encontrado um aumento significativo no grupo cisplatina ao ser comparado com os grupos: veículo, AVP25 e AVP50 ( $p < 0,0001$ ) e nos grupos cis+AVP25 e cis+AVP50 ( $p < 0,0001$ ) os níveis de peroxidação lipídica foram reduzidos de forma significativa em relação ao grupo cisplatina. ( $p < 0,0001$ ). Porém, no grupo AVP25+cis, em relação aos grupos: veículo, AVP25 e AVP50, houve aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica [ $p < 0,0001$ ]; F (5, 44) = 39,07].

### 5.5.3 Determinação da concentração cerebral de glutathiona reduzida (GSH) em cérebros de ratos submetidos ao modelo de neurotoxicidade por cisplatina.

**Figura 19:** Efeito do ácido valpróico sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo e córtex pré-frontal de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



Os dados são expressos como  $\mu\text{g/g}$  de tecido. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA, seguida do teste de tukey's. As barras dos gráficos representam a média  $\pm$  E.P.M,  $n = 6 - 8$  animais por grupo. Foi realizado o teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov test. \*\*\*\*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ ; ##### diferente em relação ao veículo  $p < 0,0001$  e ## diferente em relação ao controle  $p < 0,01$ .

Na avaliação do efeito do AVP sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal verificou-se que houve redução significativa no grupo cisplatina ao se comparar com os grupos não tratados com cisplatina: veículo, AVP25 e AVP50 ( $p < 0,0001$ ), já nos grupos cis+AVP25 e cis+AVP50 também houve redução significativa dos níveis de GSH em relação aos grupos não tratados com cisplatina ( $P <$



0,01), porém, também houve um aumento significativo dos níveis de GSH ao se comparar com o grupo cisplatina ( $P < 0,001$ ) demonstrando que o tratamento com o AVP nas duas doses estudadas possivelmente reverteu, mesmo que de forma parcial, o efeito da cisplatina sobre a redução dos níveis de GSH no córtex pré-frontal [ $F(5, 40) = 24,42$ ].

Na região do hipocampo, também se verificou que houve redução significativa no grupo cisplatina ao se comparar com os grupos não tratados com cisplatina ( $p < 0,0001$ ) e nos grupos cis+AVP25 e cis+AVP50 houve um aumento significativo dos níveis de GSH ao se comparar com o grupo cisplatina ( $P < 0,0001$ ) e não houve redução nos níveis de GSH nesses grupos em relação aos grupos não tratados com cisplatina [ $F(5, 36) = 13,76$ ].

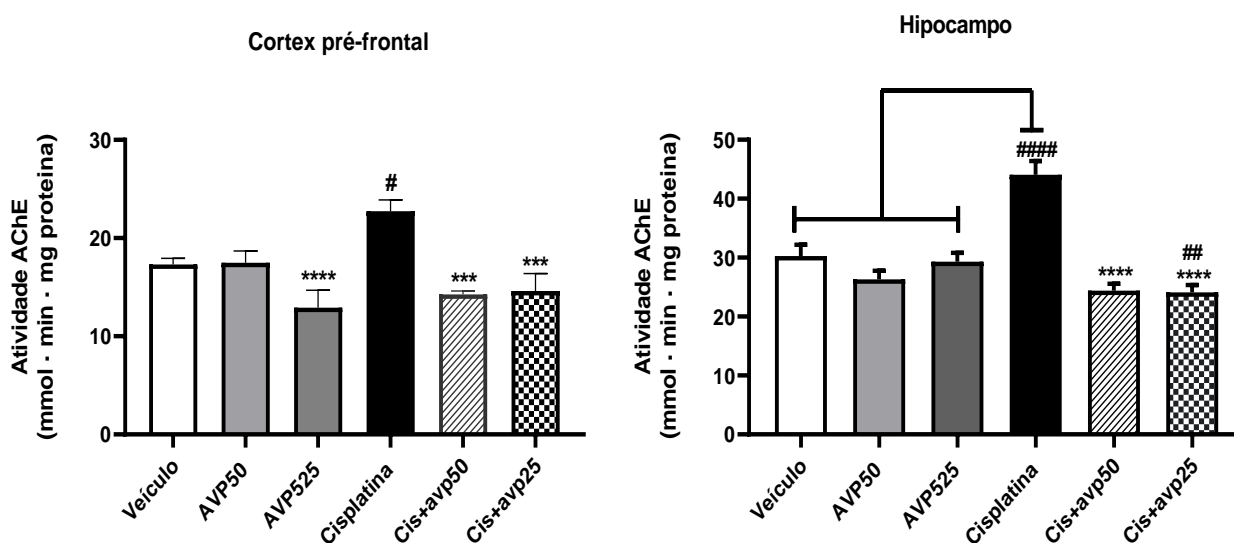
### **5.6 Determinação da atividade de Acetilcolinesterase (AChE)**

A investigação da atividade da enzima acetilcolinesterase ache foi realizada no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina pertencentes aos grupos experimentais: salina 0,9% (salina), salina 0,9% + ácido valpróico 25mg/kg (AVP 25); salina 0,9% + ácido valpróico 50mg/kg (AVP 50); salina+0,9% + cisplatina (Cisplatina), cisplatina + ácido valpróico 25mg/kg (cis+AVP25) e cisplatina + ácido valpróico 50mg/kg (cis+AVP50).

No córtex pré-frontal foi observado redução significativa da atividade da AChE no grupo AVP25 em relação ao grupo salina ( $p < 0,001$ ) e houve redução significativa nos grupos cis+AVP25 e cis+AVP50 em relação ao grupo cisplatina [ $F=(5,42) 8,786$ ].

No hipocampo foi observado que houve um aumento da atividade da AChE no grupo cisplatina em relação ao grupo salina ( $p < 0,0001$ ) e redução significativa da atividade da AChE nos grupos cis+AVP25 e cis+AVP50 em relação ao grupo cisplatina ( $p < 0,0001$ ), como também, redução significativa no grupo cis+AVP25 em relação ao grupo cisplatina [ $F=(5, 37) = 19,78 (p < 0,01)$ ].

**Figura 20-** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de AChE no córtex pré-frontal e hipocampo de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



Os dados são expressos como milimol de *acetilcolina* (ACTI) hidrolisada por minuto e por mg de proteína, ou simplesmente representam a taxa de hidrólise do ACTI pela AChE. Realizou-se ANOVA, seguida do teste de tukey's. As barras dos gráficos representam a média  $\pm$  E.P.M, n= 6 ou 8 animais por grupo. Foi realizado o teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov test. \*\*\*\*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,0001$ ; #### diferente em relação ao controle  $p < 0,0001$  e ## diferente em relação ao controle  $p < 0,05$ .

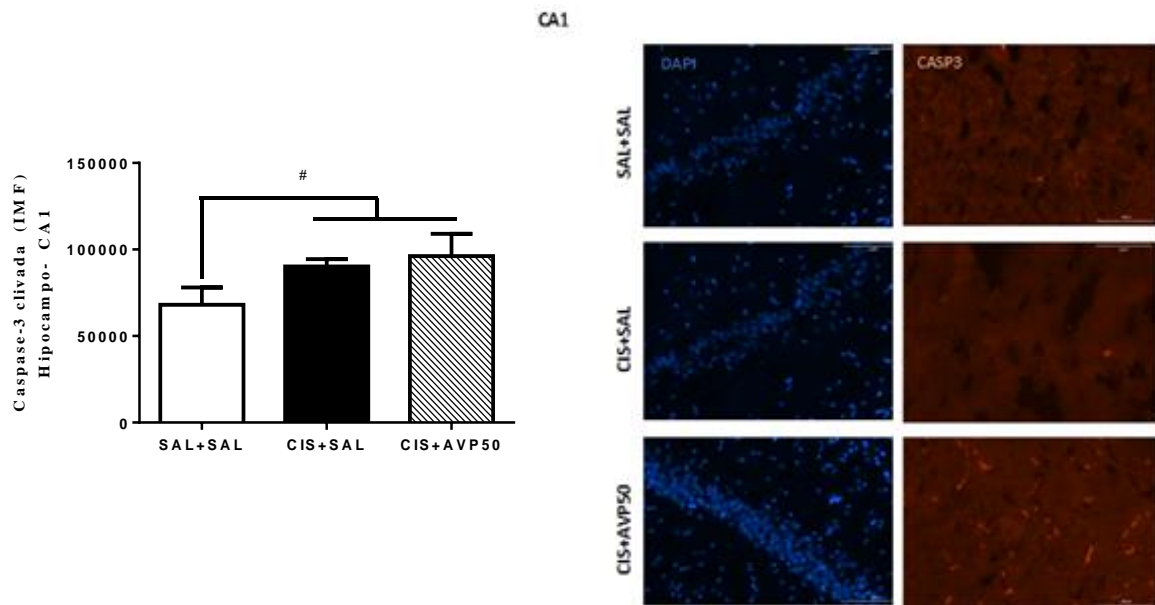
## 5.7 Análise por Imunofluorescência dos níveis de imunomarcção dos marcadores Caspase 3 e BCL2.

### 5.7.1 Análise de imunomarcção para Caspase 3 em hipocampo de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.

Os animais receberam solução salina (0,09%) ou cisplatina (5mg/kg/sem) e, foram tratados diariamente, 5 dias por semana, tratamento com AVP (25 ou 50 mg/kg, via oral) ou solução salina (0,09%), por 4 semanas. Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para ensaios de imunofluorescência, realizados com quatro animais por grupo. Abaixo, as fotomicrografias são apresentadas para cada grupo, em campos hipocampais (CA1, CA2, CA3 e DG) mostrando células coradas apenas para caspase 3 (em vermelho) e núcleos contrastados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

(em azul). A quantificação (abaixo) refere-se à densidade integrada de fluorescência nos vários subcampos hipocâmpais.

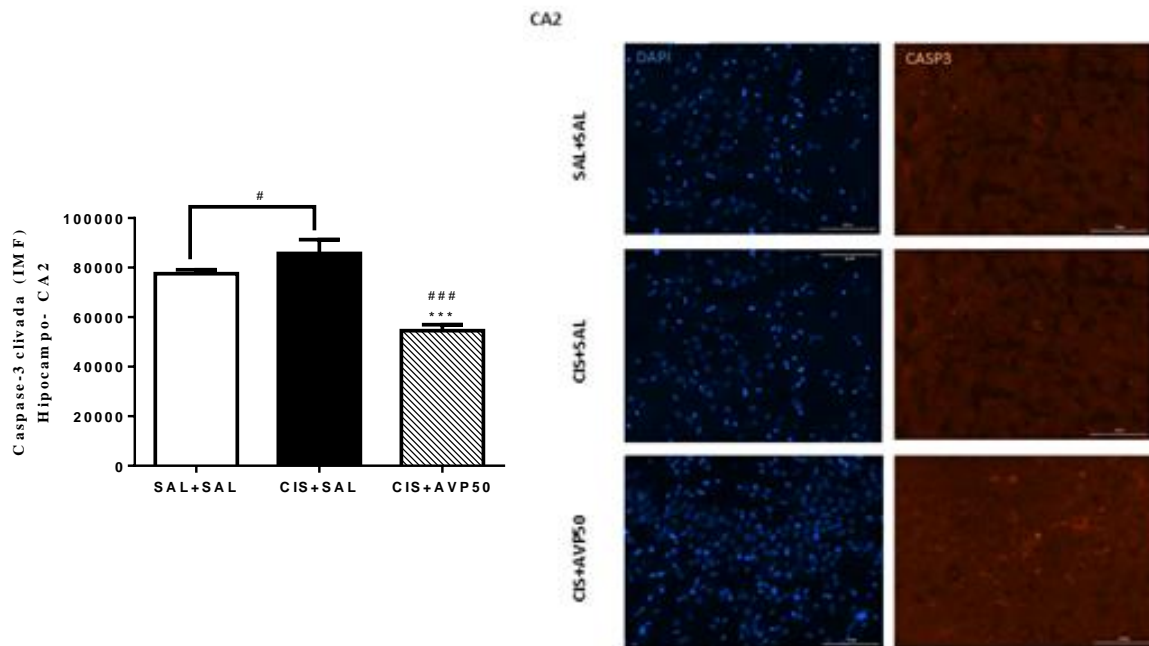
**Figura 21-** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunexpressão do marcador caspase 3 no hipocampo na região CA1 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



As barras representam a média  $\pm$  EPM (5 fotomicrografias por grupo com N:4-5 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma- via seguido do teste de Tukey como post-hoc.

Na região CA1, houve aumento significativo entre os grupos experimentais cisplatina (CIS+SAL) e CIS+AVP50 em relação salina (SAL+SAL) para a IMF de caspase 3 ( $P < 0.5$ ). (Figura 22).

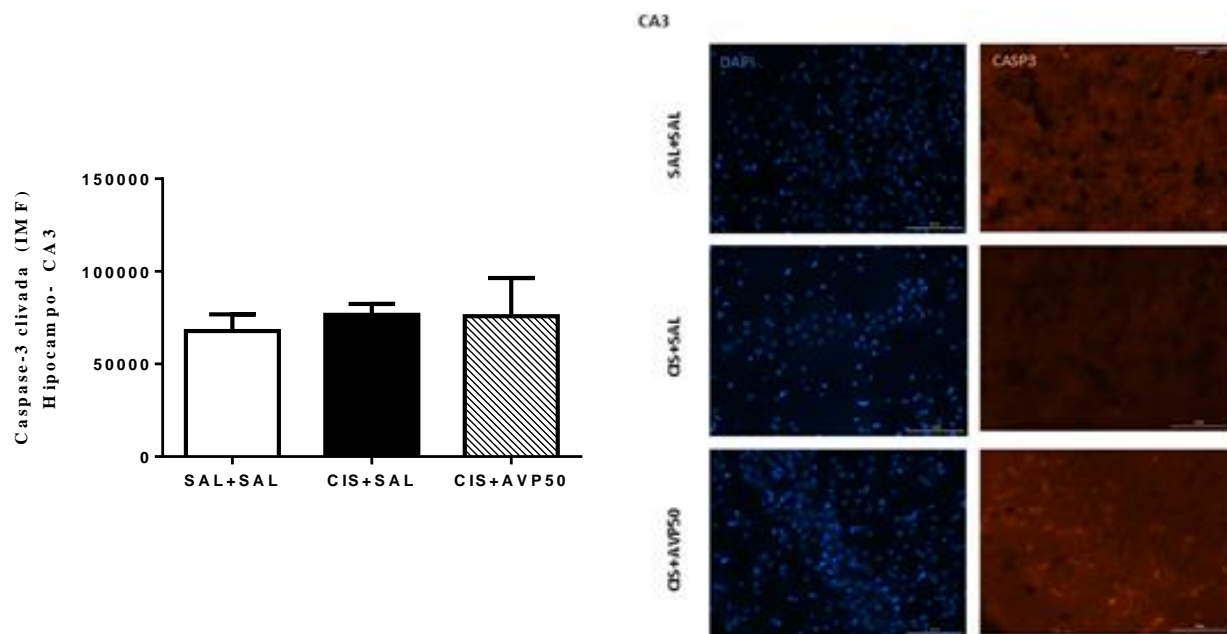
**Figura 22-** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunexpressão do marcador caspase 3 no hipocampo na região CA2 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



As barras representam a média  $\pm$  EPM (5 fotomicrografias por grupo com N:4-5 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como post-hoc. \*\*\*\*Diferença em relação cisplatina (CIS+SAL)  $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ ; ### diferente em relação a Salina (SAL+SAL)  $p < 0,001$  e #  $p < 0,05$ ).

Na região CA2, houve um aumento significativo entre os grupos experimentais cisplatina (CIS+SAL) em relação ao grupo salina (SAL+SAL) para a IMF de caspase 3 ( $P < 0,05$ ). Entretanto, no grupo CIS+AVP50 houve redução significativa para IMF de caspase 3 em relação ao grupo cisplatina (CIS+SAL) e também em relação ao grupo salina (SAL+SAL) ( $P < 0,001$ ) (Figura 23).

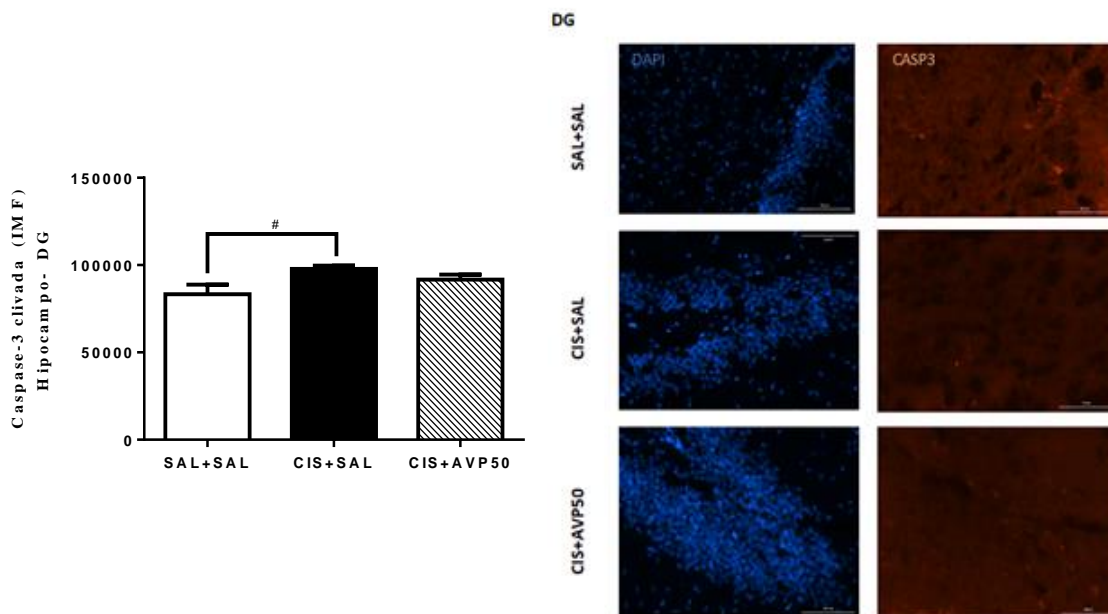
**Figura 23-** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunexpressão do marcador caspase 3 no hipocampo na região CA3 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



As barras representam a média  $\pm$  EPM (5 fotomicrografias por grupo com N:4-5 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como post-hoc.

Na região CA3, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para a IMF de caspase 3. (Figura 24).

**Figura 24**-Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunoposição do marcador caspase 3 no hipocampo na região DG (giro denteado) de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



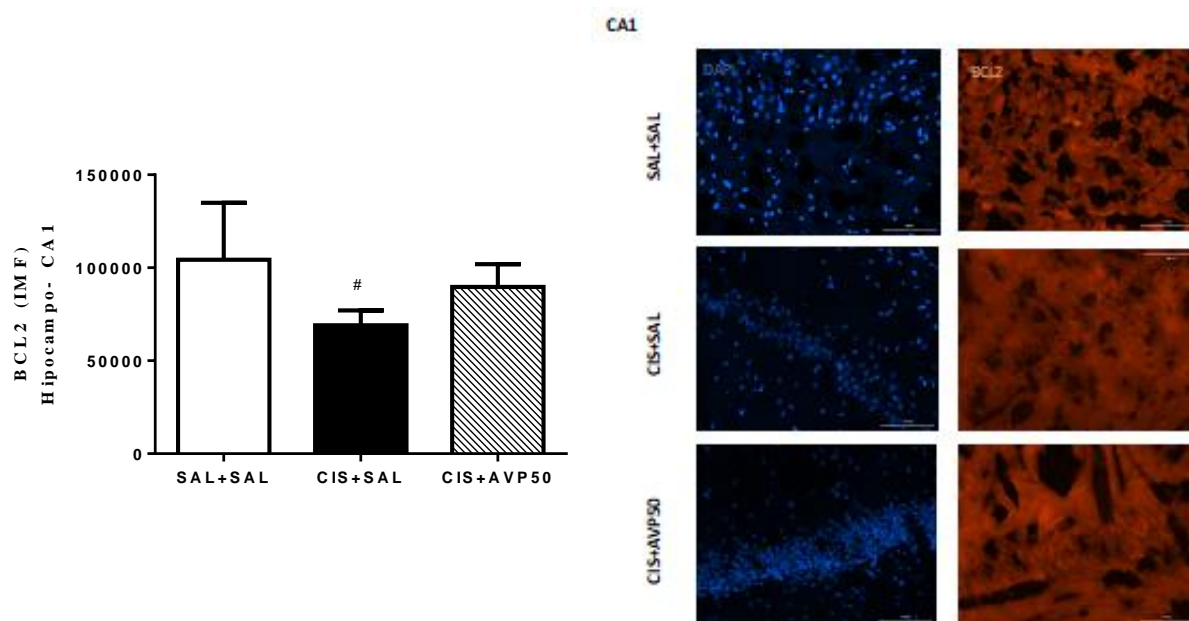
As barras representam a média  $\pm$  EPM (5 fotomicrografias por grupo com N:4-5 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como post-hoc. # diferente em relação a Salina (SAL+SAL)  $p < 0,05$ .

Na região GD, houve diferença significativa entre os grupos experimentais cisplatina (CIS+SAL) em relação ao salina (SAL+SAL) para a IMF de caspase 3. (Figura 25).

### 5.7.2 Análise de imunomarcção para BCL2 em hipocampo de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.

Os animais receberam solução salina (0,09%) ou cisplatina (5mg/kg/sem) e, foram tratados diariamente (5 dias por semana) com AVP (25 ou 50 mg/kg, via i.p.) ou solução salina (0,09%), por 4 semanas. Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para ensaios de imunofluorescência, realizados com quatro animais por grupo. Abaixo, as fotomicrografias são apresentadas para cada grupo, em campos hipocampais (CA1, CA2, CA3 e DG) mostrando células coradas apenas para BCL2 (em vermelho) e núcleos contrastados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (em azul). A quantificação (abaixo) refere-se à densidade integrada de fluorescência nos vários subcampos hipocampais.

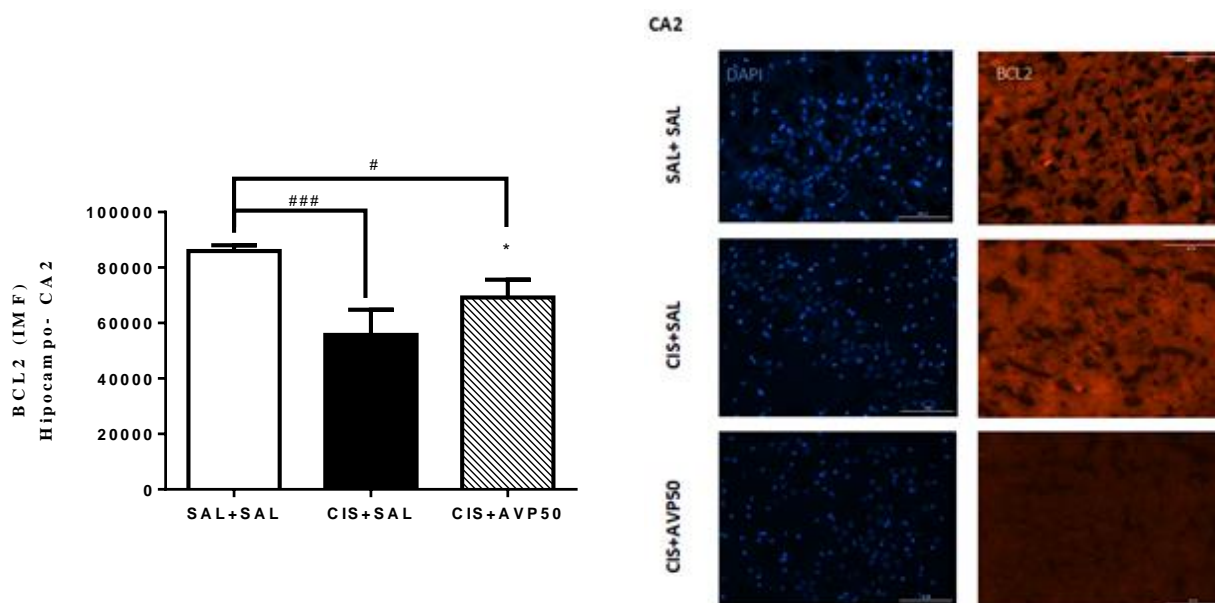
**Figura 25:** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunexpressão do marcador e BCL2 no hipocampo na região CA1 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



As barras representam a média  $\pm$  EPM (5 fotomicrografias por grupo com N:4-5 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma-vida seguido do teste de Tukey como post-hoc. # diferente em relação a Salina (SAL+Sal)  $p < 0,05$ .

Na região CA1, houve redução significativa entre o grupo experimentais cisplatina (CIS+Sal) em relação salina (SAL+Sal) para a IMF de BCL2 ( $P < 0.5$ ). (Figura 26).

**Figura 26:** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunexpressão do marcador e BCL2 no hipocampo na região CA2 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.

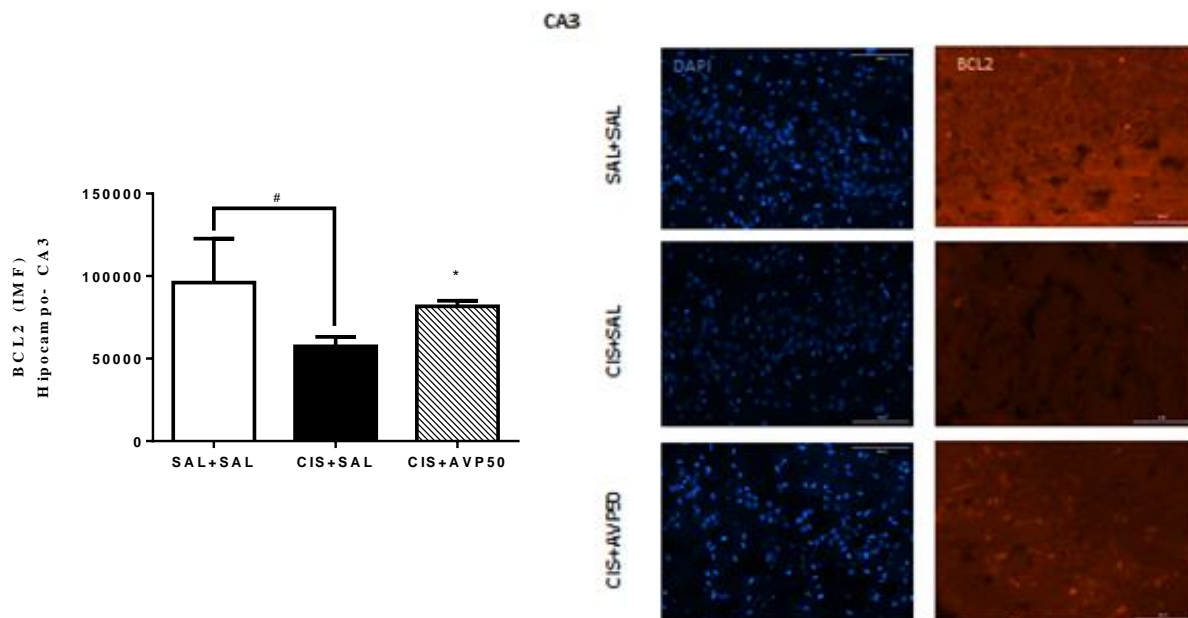


As barras representam a média  $\pm$  EPM (5 fotomicrografias por grupo com N:4-5 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma-via seguido do teste de Tukey como post-hoc. \*Diferença em relação cisplatina (CIS+SAL)  $p < 0,05$ ; ### diferente em relação a Salina (SAL+SAL)  $p < 0,001$  e # $p < 0,05$ ).

Na região CA2, houve uma redução significativa entre os grupos experimentais cisplatina (CIS+SAL) e CIS+AVP50 em relação ao grupo salina (SAL+SAL) para a IMF de BCL2 ( $P < 0,001$  e  $P < 0,5$ ). Entretanto, no grupo CIS+AVP50 houve também aumento significativo para IMF de BCL2 em relação ao cisplatina (CIS+SAL). ( $P < 0,05$ ) (Figura 27).



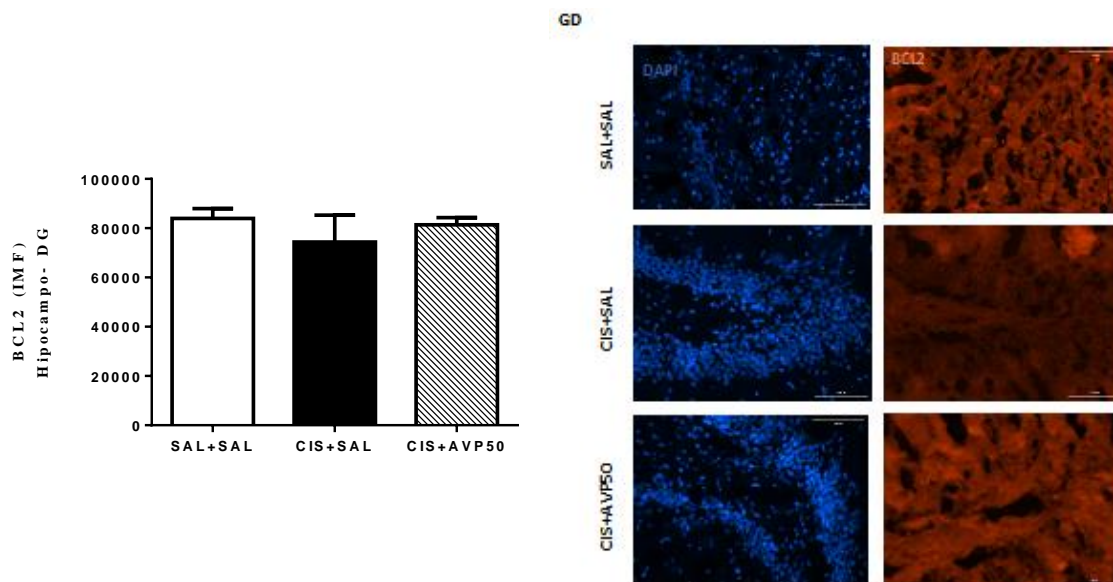
**Figura 27:** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunopressão do marcador e BCL2 no hipocampo na região CA3 de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



As barras representam a média  $\pm$  EPM (5 fotomicrografias por grupo com N:4-5 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma- via seguido do teste de Tukey como post-hoc. \*Diferença em relação cisplatina (CIS+SAL)  $p < 0,05$ ; # diferente em relação a Salina (SAL+SAL)  $p < 0,05$ ).

Na região CA3, houve redução significativa entre o grupo experimental cisplatina (CIS+SAL) em relação ao grupo salina (SAL+SAL) para a IMF de BCL2 ( $P < 0.5$ ). Entretanto, no grupo CIS+AVP50 houve aumento significativo para IMF de BCL2 em relação ao cisplatina (CIS+SAL). ( $P < 0.05$ ) (Figura 28).

**Figura 28:** Efeito do tratamento com ácido valproico nos níveis de imunexpressão do marcador e BCL2 no hipocampo na região DG (giro denteado) de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.



As barras representam a média  $\pm$  EPM (5 fotomicrografias por grupo com N:4-5 animais/grupo). Os dados foram analisados por ANOVA de uma-*via* seguido do teste de Tukey como post-hoc.

Na região DG (giro denteado), não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para a IMF de BCL2. (Figura 29).

## **5.8 Estudo do Intumescimento de mitocôndrias (*Mitochondrial Swelling*)**

Uma das marcas mais críticas da abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP) e alterações ultraestruturas é o intumescimento mitocondrial. A abertura contínua do mPTP promove despolarização, com liberação de  $Ca^{2+}$ , descontinuação da fosforilação oxidativa, inchaço da matriz com a remodelação da membrana interna e, por conseguinte, ruptura da membrana externa com liberação de citocromo c e outras proteínas apoptogênicas.

### **5.8.1 Intumescimento mitocondrial do cérebro (*swelling mitochondrial – in vitro*)**

A determinação *in vitro* do intumescimento mitocondrial foi realizada em suspensões de mitocôndrias isoladas por medição das variações de absorbância em 540 nm. O declínio da absorbância indica uma intensificação do edema mitocondrial.

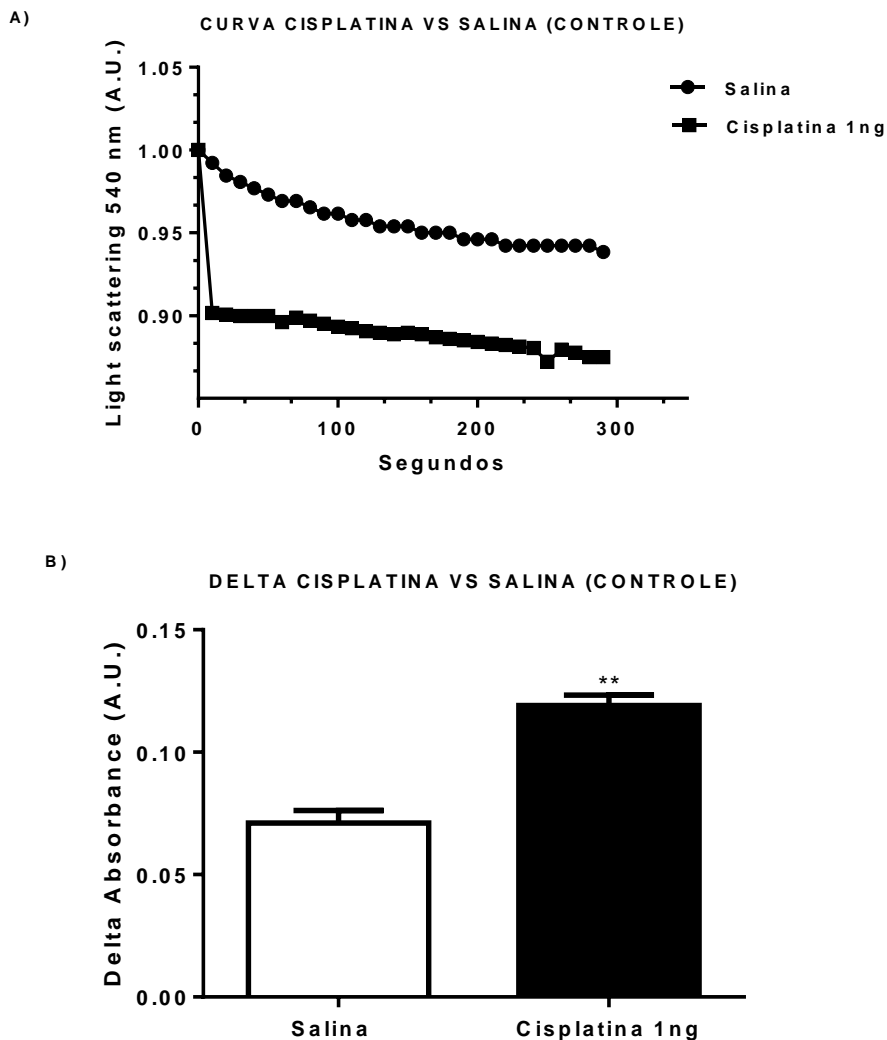
#### **5.8.1.1 Efeito da cisplatina versus salina (controle) sobre o Intumescimento de mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos.**

Primeiramente foi determinado a menor concentração de cisplatina capaz de causar alterações ultraestruturas e intumescimento mitocondrial em mitocôndrias isoladas em cérebros de ratos.

Foi encontrado a concentração de 1ng de cisplatina que ao comparar com o grupo salina (controle) observou-se um aumento drástico no edema mitocondrial ( $P=0,0020$ ). No gráfico no qual foi demonstrado a curva cisplatina *versus* salina pode-se observar um declínio da absorbância na curva cisplatina 1ng demonstrando uma intensificação de edema mitocondrial.

No gráfico (B) foi demonstrado através medição das variações de absorbância em 540 nm que houve um declínio significativo ( $P=0,0020$ ) no grupo que recebeu cisplatina na concentração de 1ng ao se comparar com o grupo que recebeu apenas solução salina.

**Figura 29-** Efeito *in vitro* da cisplatina sobre o Intumescimento em mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos.

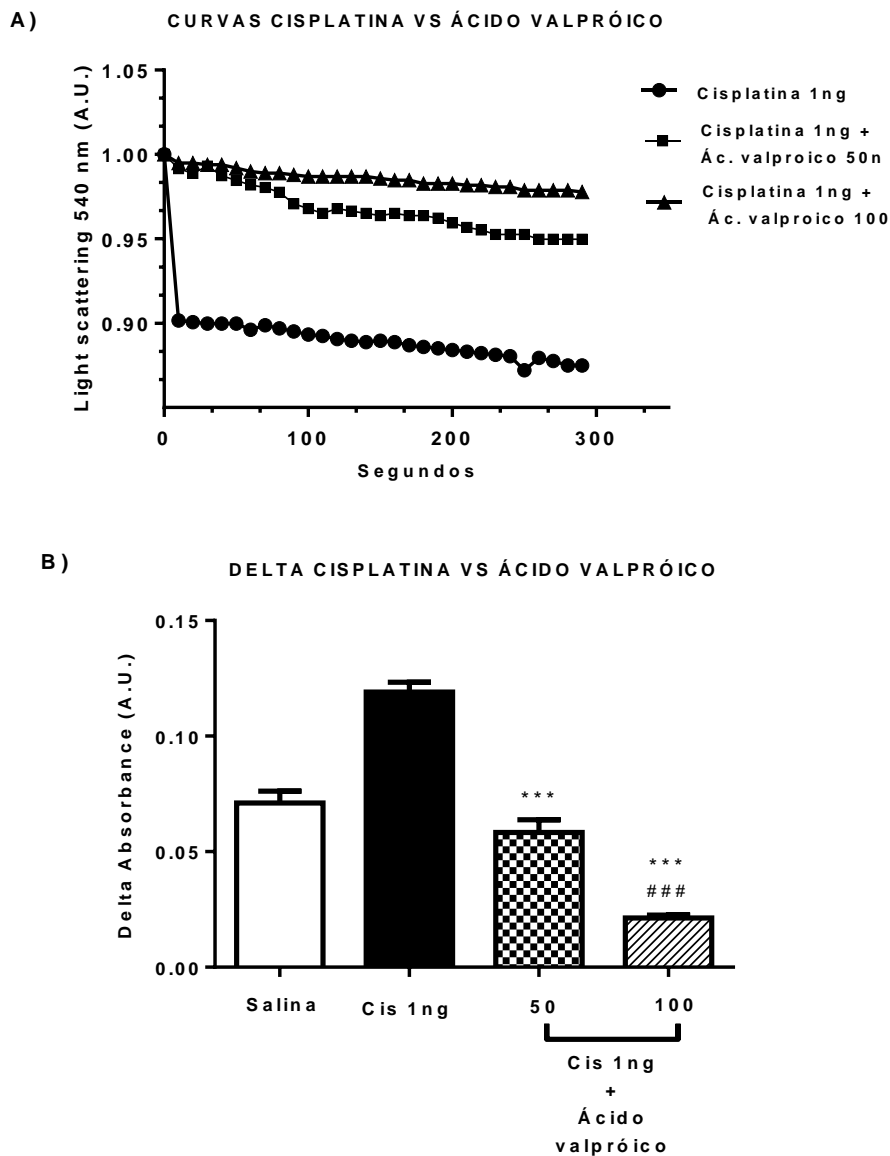


A) Curvas do *Swelling* mitocondrial, as diferenças no traçado da curva obtida de cérebros tratados com cisplatina na concentração de 1ng comparados ao grupo tratado com solução salina 0,09% (Salina). B) Medição das variações de absorbância em 540 nm. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM. Para análise estatística, por se tratar da comparação entre duas médias foi utilizado o teste *t* de students, \*\* $p < 0,01$  cisplatina vs salina.

**5.8.1.2** *Efeito da cisplatina versus cisplatina associada com ácido valproico sobre o Intumescimento mitocondrial isoladas de cérebros de ratos.*

Após a realização da avaliação do efeito da cisplatina no intumescimento mitocondrial em cérebros de ratos, foi realizado a adição ao pool mitocondrial, contendo a mesma concentração de cisplatina, AVP nas concentrações de 50 e 100ng e avaliado seu efeito (Fig. 31). Foi então observado que houve uma redução significativa a no intumescimento mitocondrial em contraste com o grupo da cisplatina ( $p < 0,001$ ).

**Figura 30-** Efeito *in vitro* da cisplatina e da cisplatina associada ao ácido valpróico nas concentrações de 50 e 100ng sobre o Intumescimento de mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos.



A) Curvas do *Swelling* mitocondrial, as diferenças no traçado da curva obtida de cérebros tratados com cisplatina na concentração de 1ng comparados aos grupos tratados com cisplatina 1ng + ácido valpróico 50ng e cisplatina 1ng + ácido valpróico 100ng. B) Medição das variações de absorvância em 540 nm nos grupos estudados. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM. Para análise estatística, foi utilizado one way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$  comparado com cisplatina e, ### $p < 0,001$  comparado ao grupo salina.

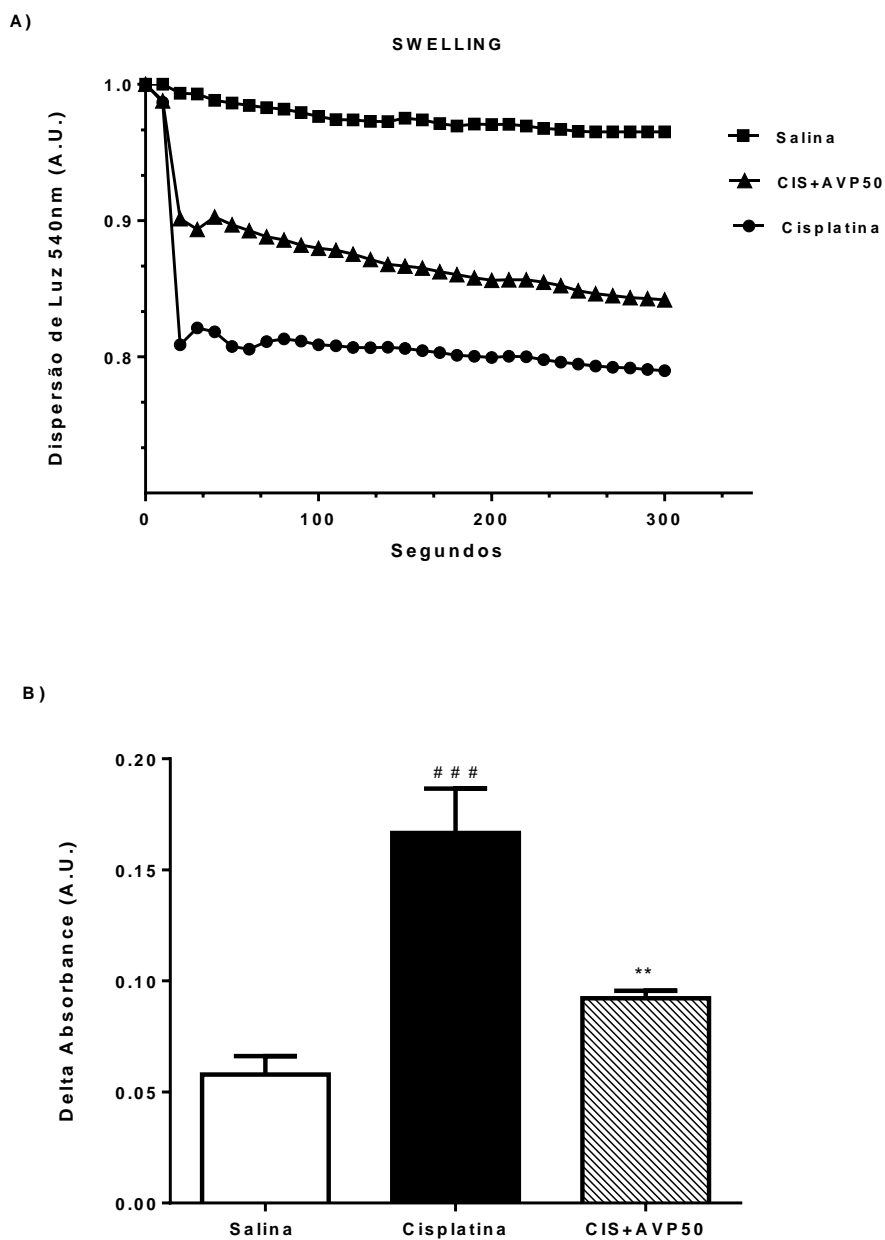
## 5.8.2 Intumescimento mitocondrial do cérebro (swelling mitocondrial – in vivo)

### 5.8.2.1 Efeito da cisplatina e da cisplatina versus ácido valpróico sobre o Intumescimento de mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina.

Foi realizado também a determinação *in vivo* do intumescimento mitocondrial em suspensões de mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina por medição das variações de absorvância por dispersão de luz em 540 nm. Na curva mostrada na Fig. 32A observa-se um declínio da absorvância no grupo tratado com cisplatina (5mg/kg/sem) + solução salina (0,9%) que indica uma intensificação do edema mitocondrial, porém, no grupo que foi tratado com cisplatina (5mg/kg/sem) + AVP (50mg/kg/dia): Cis+AVP50, o declínio foi bem menor em relação ao grupo cisplatina, demonstrando um efeito protetor do AVP sobre o intumescimento mitocondrial gerado pela cisplatina.

O gráfico demonstrado na figura 32B avalia o nível de intumescimento mitocondrial por grupo estudado. Nota-se que no grupo cisplatina houve um nível bem mais elevado de intumescimento mitocondrial comparado com o grupo salina [ $P < 0,001$ ;  $F(2, 12) = 19,51$ ] e que no grupo AVP50 + cis houve um nível de intumescimento muito menor significativamente em relação ao grupo cisplatina ( $P < 0,01$ ).

**Figura 31-** Efeito *in vivo* do ácido valproico (50mg/kg/dia) em cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina (5mg/kg/sem) sobre o Intumescimento de mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos.



A) Curvas do *Swelling* mitocondrial, as diferenças no traçado da curva obtida de cérebros tratados com cisplatina (5mg/kg/sem) +salina (cisplatina) comparados aos grupos tratados com solução salina 0,9% (Salina), cisplatina + ac. valproico 50mg/kg (AVP50). B) Medição das variações de absorvância em 540 nm nos grupos estudados. Os valores são médias  $\pm$  E.P.M, n= 6 animais por grupo. Para análise estatística, foi utilizado one way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey \*\*Diferença em relação a cisplatina  $p < 0,01$  e ### diferente em relação a salina (controle)  $p < 0,001$ .



## 5.9 Consumo de oxigênio mitocondrial no cérebro

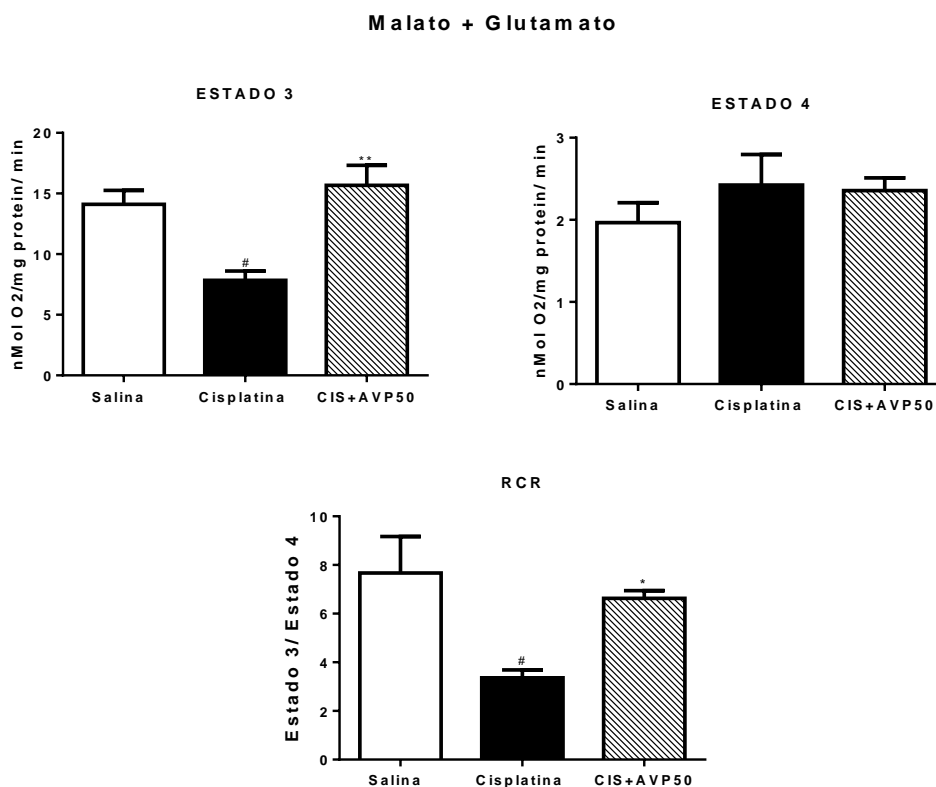
A investigação dos parâmetros respiratórios mitocondrial foi realizada no cérebro de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina pertencentes aos grupos experimentais: salina 0,9% (salina), cisplatina + salina+0,9% (Cisplatina), e cisplatina + ácido valpróico 50mg/kg (cis+AVP50).

Foram analisados os parâmetros respiratórios estados 3 e 4 da respiração mitocondrial e a razão de controle respiratório (RCR) que corresponde a relação entre a taxa de respiração ativa (estado 3) e de repouso (estado 4). Os parâmetros respiratórios foram determinados através da medida do consumo de oxigênio utilizando glutamato/malato, ou succinato como substratos.

Quando as preparações mitocondriais foram estimuladas por glutamato/malato (fig.33) foi observado que o grupo cisplatina diminuiu significativamente o estado 3 [ $F(2, 12) = 17,37$ ;  $p < 0,05$ ] e o RCR (razão de controle respiratório) em relação ao grupo salina [ $F(2, 12) = 9,791$ ;  $p < 0,05$ ]. Já o grupo Cis+AVP50 aumentou significativamente o estado 3 e o RCR (razão de controle respiratório) em relação ao grupo cisplatina ( $p < 0,05$ ). Em relação ao estado 4 não foi encontrado diferença significativa entre os grupos.

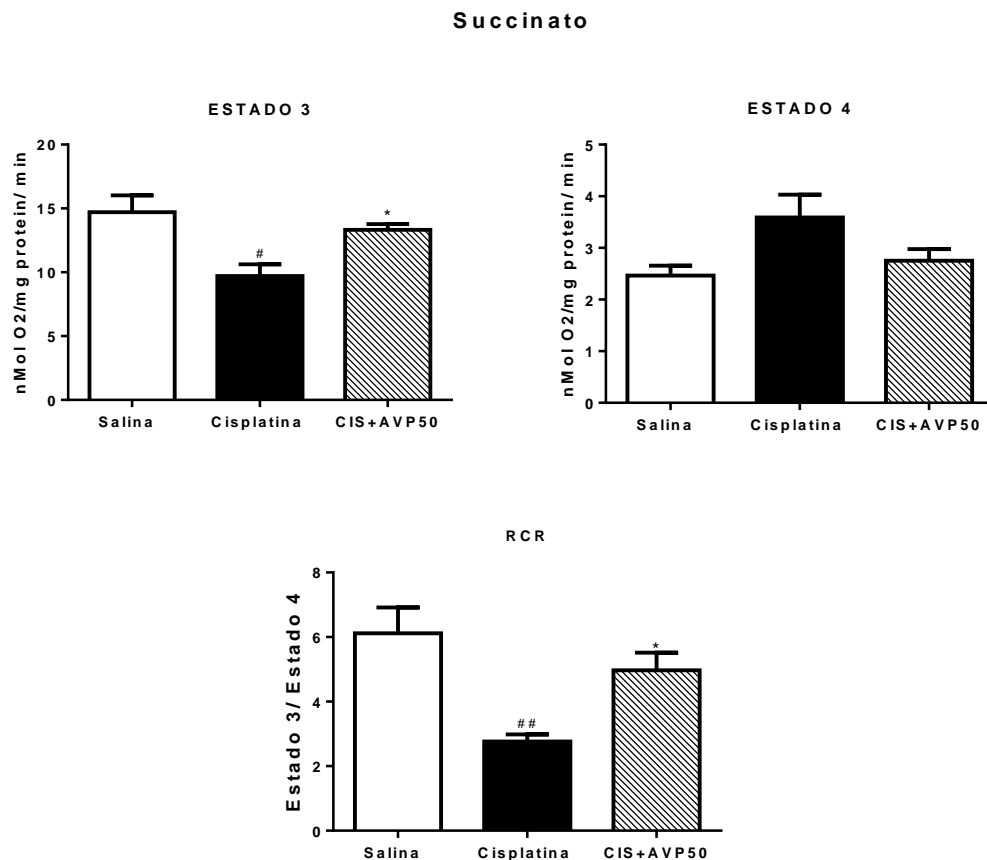
Quando as preparações mitocondriais foram estimuladas por succinato (fig 34) foi também observado no grupo cisplatina redução significativa no estado 3 [ $F(2, 12) = 8,820$ ;  $p < 0,05$ ] e no RCR em relação ao grupo salina [ $F(2, 12) = 13,17$ ;  $p < 0,05$ ]. Bem como, no grupo Cis+AVP50, houve aumento significativo no estado 3 e o RCR em relação ao grupo cisplatina ( $p < 0,05$ ). Não havendo diferença significativa entre os grupos em relação ao estado 4.

**Figura 32:** Efeito *in vivo* do ácido valproico em cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina sobre o consumo de oxigênio no estado 3, estado 4 e razão de controle respiratório (RCR) utilizando-se malato/glutamato como substrato.



Efeito *in vivo* do ácido valproico (50mg/kg/dia) em cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina (5mg/kg/sem) sobre o consumo de oxigênio no estado 4 (estimulado por oligomicina), estado 3 (estimulado por ADP), razão de controle respiratório (RCR) utilizando-se malato/glutamato como substrato. Os valores são médias  $\pm$  E.P.M, n= 6 animais por grupo. \*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,05$ , \*\* diferente em relação a cisplatina  $p < 0,01$  e # diferente em relação ao controle  $p < 0,05$ .

**Figura 33:** Efeito *in vivo* do ácido valproico em cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina sobre o consumo de oxigênio no estado 4, estado 3, razão de controle respiratório (RCR) utilizando-se succinato como substrato.



Efeito *in vivo* do ácido valproico (50mg/kg/dia) em cérebros de ratos submetidos a neurotoxicidade causada por cisplatina (5mg/kg/sem) sobre o consumo de oxigênio no estado 4 (estimulado por oligomicina), estado 3 (estimulado por ADP), razão de controle respiratório (RCR) utilizando-se succinato como substrato. Os valores são médias  $\pm$  E.P.M, n= 6 animais por grupo. \*Diferença em relação cisplatina  $p < 0,05$ ; ## diferente em relação ao controle  $p < 0,01$  e # diferente em relação ao controle  $p < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram, pela primeira vez, quais os efeitos do ácido valpróico (AVP) nas doses de 25mg/kg e 50mg/kg na neurotoxicidade induzida pelo tratamento com cisplatina na dose de 5mg/kg/sem durante quatro semanas. Diversos estudos usando esse modelo de tratamento demonstraram que a cisplatina induziu déficits cognitivos e danos ao cérebro em roedores (CHTOUROU *et al.*, 2015; LOMELI *et al.*, 2014; MEHMET Oz *et al.*, 2015).

Publicações anteriores também demonstraram que, tanto estudos em humanos (JANELSINS *et al.*, 2014; SIMO *et al.*, 2013; VICHAYA *et al.*, 2015; WEFEL AND SCHAGEN, 2012) quanto em animais (CHTOUROU *et al.*, 2015; LOMELI *et al.*, 2014; MEHMET OZ *et al.*, 2015) tratados com cisplatina, além de outros efeitos adversos sistêmicos, incluindo hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, (CHOI *et al.*, 2013; SEN *et al.*, 2013; WASEEM & PARVEZ, 2013;), mostram sinais de déficit de memória, prejuízos na atenção e no funcionamento executivo (CHTOUROU *et al.*, 2015; SHABANI *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2016;).

Pensando na avaliação sistêmica e assim avaliar o custo-benefício para o paciente em tratamento com cisplatina, avaliamos também os efeitos da administração do ácido valproico, nas doses estudadas, sobre alguns parâmetros (marcadores) hematológicos, renais e hepáticos, bem como, realizamos a análise da taxa de sobrevivência e de mortalidade e da evolução do peso corporal antes e durante o tratamento. Portanto, será iniciada a discussão dos resultados do presente estudo pelos parâmetros bioquímicos e hematológicos, seguida da avaliação da sobrevivência e mortalidade e posteriormente dos dados mais específicos.

Iniciando pelos marcadores hematológicos, analisamos os seguintes parâmetros: número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, número de leucócitos e número de plaquetas. A anemia hemolítica é comumente encontrada em paciente tratados com cisplatina quando a medicação é administrada uma vez a cada 3 a 4 semanas (ARAÚJO *et al.*, 2019; BRUNTON, 2019), fato que também foi observado neste trabalho. Estudos recentes demonstraram que ratos tratados com cisplatina apresentaram anemia, trombocitopenia, diminuição na porcentagem de hemoglobina e leucopenia (BHALCHANDRA *et al.*, 2018; HASHEM *et al.*, 2020).

Ao analisar os grupos experimentais, foi possível verificar que os achados do presente estudo corroboram os encontrados em estudos anteriores, pois a cisplatina reduziu os parâmetros como números de hemácias, hematócrito, hemoglobina e leucócitos nos grupos tratados com cisplatina em relação aos não tratados e que o AVP não interferiu nesses resultados.

Em contrapartida, embora seja descrito que o AVP tenha como efeitos adversos, dentre eles, alterações hematológicas, como anemia aplásica e trombocitopenia (MARANHÃO *et al*, 2011), no presente estudo, observamos que o AVP interferiu, provavelmente, apenas no número de plaquetas, pois, houve também redução significativa nos grupos AVP25 e AVP50 (tratados com ácido valproico + salina) em relação ao grupo salina, como também nos grupos tratados com cisplatina. Nos grupos cis+AVP25 e cis+AVP50 não houve alteração significativa em relação aos grupos AVP25 e AVP50. Portanto, observamos que, apesar do AVP possuir uma toxicidade hematológica intrínseca, não houve aumento da toxicidade induzida pela cisplatina quando as duas drogas foram associadas.

Dentre os efeitos tóxicos sistêmicos da cisplatina, os hepáticos são muito significativos (WASEEM & PARVEZ, 2013). Estudos revelam que os biomarcadores mais sensíveis e diretamente envolvidos no dano celular e toxicidade são as transaminases, devido ao fato de serem liberadas na circulação após dano celular (DASARI *et al*, 2014; ISERI *et al.*, 2007). Ao realizar a análise da atividade das transaminases foi observado que, conforme descrito em outros estudos, houve um aumento significativo dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) nos grupos tratados com cisplatina, em relação aos grupos não tratados com cisplatina. No que se refere a alanina aminotransferase (ALT) o aumento significativo ocorreu apenas no grupo cisplatina (cisplatina + salina) em relação aos grupos não tratados com cisplatina.

Apesar da literatura descrever uma alteração das transaminases e insuficiência hepática reversível relacionada a dose de AVP, especialmente em crianças maiores de 2 anos, em nosso estudo, nas doses e período de administração do AVP, não foi observado aumento significativo desses marcadores (ANTONIUK *et al*, 1996; ZHU *et al*, 2017).

A manutenção da função renal adequada é de extrema importância para a nossa sobrevivência, pois, dentre as inúmeras funções dos rins, estão a eliminação de diversas toxinas, o controle hidroeletrólítico, o controle da pressão arterial e a participação na eritropoiese (EATON & POOLER, 2016; MELLO *et al*, 2021). Vários estudos descrevem que o desproporcional acúmulo de cisplatina no tecido renal contribui para a nefrotoxicidade (ARANY E SAFIRSTEIN, 2003) sendo a principal via de excreção deste fármaco (DASARI *et. al*, 2014). São achados comuns após o tratamento com cisplatina a redução de 20% a 40% a taxa de filtração glomerular, assim como o aumento nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina (TCHOUNWOU *et. al*, 2021; DASARI *et. al*, 2014; SANTOS, 2006).

Em nosso estudo, foram avaliados os marcadores renais ureia e a creatinina e comparado os parâmetros entre os grupos experimentais. Embora estudos mostrem que a creatinina se eleva tardiamente no sangue, ela tem sido utilizada como biomarcador de doença renal crônica (DRC) e injúria renal aguda (IRA) (PERES *et. al*, 2013). No presente estudo, ao avaliar os níveis de creatinina nos grupos experimentais, observamos que a cisplatina alterou de forma significativa esses parâmetros, resultado que foi encontrado nos grupo cisplatina e cis+AVP25 em relação aos grupos não tratados com cisplatina. Porém no grupo cis+AVP50 e nos grupos apenas tratados com AVP não houve alteração significativa demonstrando que, provavelmente, o tratamento com AVP nas doses estudadas, não colaborou com a alteração dos níveis de creatinina.

Purena *et. al*. (2018) descreveu que o tratamento com dose única de cisplatina 12mg/kg foi capaz de elevar os níveis de creatinina e de ureia. Resultado semelhante ao encontrado em nosso estudo. Em outras publicações anteriores, foi descrito que, ratos apresentaram sinais de nefrotoxicidade por cisplatina com uma dose > 5 mg/kg (BABU *et. al*, 1995; DEWOSKIN *et. al*, 1992), portanto, as doses administradas em nosso protocolo experimental, provavelmente, foram capazes de gerar danos renais.

Assim como a creatinina, a ureia também é utilizada como um marcador renal clássico. Embora não seja um composto específico, a ureia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo e sua excreção é 90% realizada pelos rins (DUSSE *et al*, 2017). Em relação ao marcador ureia, verificou-se que houve alteração significativa dos níveis de ureia em todos os grupos tratados com

cisplatina em relação aos grupos não tratados. Portanto não havendo diferença entre os grupos tratados somente com cisplatina ou tratados com cisplatina e AVP.

Hosseinian *et. al* (2016) descreveu em seu estudo que foi necessário o tratamento com apenas dose única de 6mg/kg de cisplatina para causar aumento dos níveis ureia e creatinina no sangue de ratos. Segundo Biesterveld *et al* (2021) o AVP foi capaz de reduzir os níveis de creatinina em modelo agudo de injuria renal por hemorragia e trauma. Em estudo de modelo de lesão renal induzido por doxorubicina, o AVP preveniu a proteinúria e atenuou alterações inflamatórias no rim e causou diminuição da apoptose glomerular (VAN BENEDEN *et al*, 2011).

Como descrito em diversos estudos, sabe-se que a cisplatina é um antineoplásico muito eficiente para o tratamento de vários tipos de câncer, porém possui severos efeitos adversos, como a presença de anorexia, diarreia, extrema perda de peso levando a caquexia, como também, outras diversas complicações que podem, inclusive, levar o paciente a óbito (DASARI *et. al*, 2014; TCHOUNWOU *et al*, 2021). No presente estudo também foi avaliado a evolução do peso antes e durante a realização do protocolo experimental, como também, o percentual de mortalidade e sobrevida dos animais.

Em relação a avaliação do peso, foi observado que nos grupos que não foram tratados com cisplatina houve uma evolução de ganho ponderal semanal, não havendo perda de peso em nenhum desses grupos. Entretanto, ao ser avaliado os grupos tratados com cisplatina, foi verificado que todos os grupos apresentaram curva descendente de peso durante as semanas de tratamento, resultado que é compatível com outros estudos (GARCIA *et. al*, 2013; MEHMET OZ *et al.*,2015). Estudos anteriores sugerem que a cisplatina leva a lipólise e a oxidação da gordura, além de prejudicar a lipogênese e a deposição de lipídios em camundongos (LIN *et. al.*, 2021; GARCIA *et. al*, 2013). Portanto, melhorar esse efeito adverso favorece tanto uma melhor tolerância ao tratamento quanto uma maior qualidade de vida.

No entanto, observamos que o grupo AVP50+cis obteve significativamente uma menor perda de peso em relação ao grupo cisplatina (cisplatina + salina), dado que demonstra que o AVP apresentou efeito benéfico favorecendo uma menor perda de peso. O favorecimento do ganho de peso pelo AVP é um efeito adverso já descrito na literatura. Estudos sugerem que o mecanismo que o AVP favorece a ganho de peso ainda é discutido. Porém, algumas hipóteses sugerem que seria uma consequência do efeito no

aprimoramento da transmissão GABA dentro do eixo hipotalâmico que resultaria em aumento do apetite (BITON *et al.*, 2003; BOGUSZEWSKI & KULAK, 2008; BELCASTRO *et. al*, 2013). Esse efeito adverso, portanto, torna-se benéfico para o paciente que está em tratamento com a cisplatina.

Ao realizarmos a avaliação dos percentuais de mortalidade e sobrevida o grupo cisplatina (cisplatina + salina) teve o maior percentual de mortalidade (50%) e menor percentual de sobrevida (50%) em relação aos outros grupos experimentais. Já os grupos que receberam cisplatina e AVP, houve queda da mortalidade e aumento da sobrevida. No grupo cis+AVP50 a taxa de mortalidade foi de 23,8% e sobrevida 76,1% e o grupo AVP25+cis 36,5% de mortalidade e 63,4% de sobrevida, demonstrando que o ácido valpróico proporcionou uma maior resistência aos animais durante o tratamento com cisplatina. Nos grupos que não receberam tratamento com cisplatina, os animais se mantiveram vivos durante todo o período.

Mehmet Oz *et al.*, (2015) demonstrou em sua publicação que durante a realização do protocolo experimental semelhante ao do presente estudo, houve a morte de quatro animais no grupo tratado somente com cisplatina (5mg/kg/sem) e salina 0,9%, apresentando, portanto, uma mortalidade de 40%, já que era um grupo de dez animais. Além disso, em estudos anteriores em diversos modelos animais, o AVP tem demonstrado efeito sobre o aumento do percentual de sobrevida dos animais (BIESTERVELD *et. al*, 2019; WILLIAMS *et. al*, 2019; ZÁDORI *et. al*, 2009).

Em relação aos testes comportamentais, neste estudo, demonstramos que ratos adultos tratados com cisplatina 5mg/kg/sem, por quatro semanas consecutivas, exibem redução da capacidade exploratória e locomotora avaliados através do teste de campo aberto (“open field test”), que é um teste comportamental clássico para avaliar a capacidade locomotora e exploratória em ratos e camundongos (HALL, 1934). Os animais apresentaram também déficits cognitivos significativos, incluindo aprendizagem e disfunções de memória de trabalho avaliadas por teste de labirinto em Y (“Y maze”), acompanhados de comprometimento da memória declarativa ou de reconhecimento avaliado pelo teste de reconhecimento de objeto novo (NOR).

Esses resultados estão de acordo com outros estudos que também encontraram comprometimento cognitivo em ratos tratados com cisplatina (CHTOUROU *et al*, 2015; HILL *et. al*. 2010; LOMELI *et al.*, 2016; SHABANI *et. al*. 2012; ZHOU *et.*



*al.*, 2016; XIAO *et al.*, 2018) e em pacientes com câncer (AMIDI *et al.*, 2017; VARDY *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2019). Várias evidências em estudos *in vivo* mostraram que tanto a cisplatina prejudicou o desempenho no teste do labirinto Y e quanto no teste do labirinto aquático de Morris, indicando a disfunção da capacidade espacial (CHIU *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2018; JANGRA *et al.*, 2016; LIM *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2018; ONGNOK *et al.*, 2019).

O teste do campo aberto avalia a atividade locomotora através da determinação da distância percorrida pelo número de cruzamentos (*crossings*) e atividade exploratória através de levantamentos (*rearings*) (BROADHURST, 1957; HALL, 1934). Os resultados obtidos no teste de campo aberto, realizados nesse estudo, mostram que no grupo de animais que receberam somente cisplatina (cisplatina + salina) houve redução significativa tanto do número de cruzamentos (“*crossing*”) quanto de “*rearing*” em relação aos grupos que não foram tratados com cisplatina. Demonstrando que a cisplatina reduziu a capacidade exploratória e locomotora dos animais, dado que está de acordo com outros estudos que apresentaram resultados semelhantes (CHTOUROU *et al.*, 2015; GOLCHIN *et al.*, 2015; SHABANI *et al.*, 2012).

Ongnok *et al.* (2019) descreveu em sua revisão sobre o comprometimento cognitivo gerado pela cisplatina, coloquialmente conhecido como "*chemobrain*", que os aspectos da função cerebral mais afetados incluíam a disfunção na memória, na atenção, na aprendizagem, na função executiva e na atividade locomotora (AHLES *et al.*, 2002; CASTELLON *et al.*, 2004; TCHEN *et al.*, 2003; KESLER *et al.*, 2013; VAN DAM *et al.*, 1998; YAMADA *et al.*, 2010; WEFLET *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2016).

No entanto, quando ratos expostos a cisplatina foram tratados com AVP na dose de 50mg/kg, houve aumento significativo tanto do número de cruzamentos (“*crossing*”) quanto de “*rearing*” em relação ao grupo “cisplatina” (cisplatina + salina 0,9%) e não houve alteração significativa em relação ao controle (salina), demonstrando que o AVP na dose 50mg/kg foi capaz de reverter, mesmo que parcialmente, os efeitos da cisplatina na capacidade exploratória e locomotora dos animais.

Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por XIMENES *et al.* (2015), que descreveu que o tratamento com AVP 50mg/kg em modelo animal de doença de Parkinson conseguiu reverter completamente o comprometimento da atividade locomotora e exploratória. Em outro estudo, KIM *et al.* (2019), também descreveu

melhora da atividade locomotora em estudo de neuroproteção em camundongos transgênicos. Também já foi demonstrado que vários inibidores de HDACs melhoram os déficits motores em modelos de camundongos de Doença de Huntington (HOCKLY *et. al.*, 2003; MONTI *et. al.*, 2009; SADRI-VAKILI *et. al.*, 2007).

O teste “Y maze” ou labirinto em Y é utilizado na avaliação da memória de trabalho dos animais, no qual é observando o número de alterações espontâneas corretas realizadas pelo animal (PLASCHKE; HOYER, 1993). Segundo IZQUIERDO (2011), a memória de trabalho é um componente da função executiva, uma determinada extensão da memória imediata, que ocupa outras estruturas neurais como o córtex pré-frontal. Sendo, portanto, um espaço mental de trabalho necessário nas atividades cognitivas complexas, como por exemplo, o processo de leitura, pois, ela conserva na consciência as seqüências de palavras, que formam uma frase por tempo suficiente até que haja significação (BADDELEY; A. EYSENCK, 2011; LENT, 2010; IZQUIERDO, 2011).

Sendo assim, é considerado memória de trabalho um sistema cerebral que fornece armazenamento temporário e manipulação das informações necessárias para tarefas cognitivas complexas como a compreensão da linguagem, leitura, aprendizagem, operações matemáticas, pensamento e raciocínio. (ANDRADE; BUENO, 2004; GOFF, 2005).

Ao analisarmos o teste do labirinto em Y, encontramos resultado semelhante ao campo aberto, pois o desempenho do grupo AVP50+cis foi semelhante aos grupos que não foram expostas a cisplatina. Portanto, havendo um aumento significativo de alterações corretas em relação ao grupo cisplatina, resultado que demonstra um efeito benéfico do AVP sobre a memória de trabalho e a capacidade de reverter os danos causados pela cisplatina na realização desse teste.

Foi demonstrado em estudos anteriores que o tratamento de camundongos machos ou fêmeas adultos jovens com cisplatina reduziu o desempenho em uma série de tarefas comportamentais que avaliam a orientação espacial e memória de curto prazo, incluindo a teste de reconhecimento social e o teste de reconhecimento de objetos novo, e as alternâncias espontâneas no teste de labirinto em Y (CHIU *et al.*, 2017; CHIU *et. al.*, 2018; ZHOU *et. al.*, 2016). HUO *et. al.* (2018) também descreveu resultados semelhantes com camundongos adultos. Além disso, a memória episódica defeituosa no teste de reconhecimento de objeto novo e no teste de reconhecimento social foi ainda confirmada

pelas anormalidades da função hipocampal em modelo animal (CHIU *et al.*, 2017; JANGRA *et al.*, 2016; LOMELI *et al.*, 2017; KEENEY *et al.*, 2018; MA *et al.*, 2018; TCHOUNWOU *et al.*, 2021; RAMALINGAYYA *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2016).

Realizamos a avaliação da memória de reconhecimento através do teste de reconhecimento de objeto novo (NOR), baseando-se na tendência natural dos animais de explorar preferencialmente objetos novos em detrimento dos familiares em uma arena de campo aberto (ENNACEUR, 1988). Sendo um teste robusto e bastante utilizado para avaliar algumas regiões do cérebro como hipocampo, córtex perirrinal (WIN- SHWE *et al.*, 2011). Essa tarefa do reconhecimento de objeto está intimamente relacionada com o bom funcionamento do hipocampo, bem como, a codificação, a consolidação e a recuperação da memória, que, por sua vez, também está relacionada com o córtex perirrinal (WINTERS *et al.*, 2008).

Os animais do grupo cisplatina, isto é, que foram expostos apenas a cisplatina (5mg/kg/sem) e salina 0,9%, apresentaram déficit na memória de reconhecimento, resultados que corroboram com outros estudos, nos quais foram encontrados déficits significativos na avaliação da memória de reconhecimento a partir do teste do reconhecimento de objeto novo (NOR), apresentando menor índice de reconhecimento (; LOMELI *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2012). Porém, nos grupos expostos a cisplatina e que receberam tratamento com ácido valproico (cis+AVP25 e cis+AVP50), houve aumento significativo do desempenho no NOR em relação aos animais do grupo cisplatina. Mas a melhor dose, na qual houve desempenho semelhante aos grupos não tratados com cisplatina, foi a de 50mg/kg (cis+AVP50).

Ainda em relação aos testes labirinto em Y e NOR, encontramos em estudo anterior em modelo de Doença de Alzheimer que o AVP também demonstrou ser eficiente na melhora do desempenho dos animais nos testes mencionados (SORIAL & SAYED, 2017). Segundo LU *et al.* (2012), outros inibidores da histona desacetilase também apresentaram resultados semelhantes na melhora da cognição no teste labirinto em Y. Assim como diversos autores, mostraram melhora no desempenho dos animais no NOR em diferentes modelos de Doença de Alzheimer e outros distúrbios neurológicos (HAETTIG *et al.* 2011; KORZUS *et al.* 2004; STEFANKO *et al.* 2009). Em um modelo animal induzido por convulsão, tratados com AVP, ratos também mostraram preferência para o objeto novo no NOR (JESSBERGER *et al.* 2007).

O AVP possui uma atividade farmacológica muito complexa, exercendo seus efeitos por diversos mecanismos e alvos farmacológicos, podendo, portanto, influenciar várias vias regulatórias (MONTI *et. al.*, 2009; SINGH *et. al.*, 2021). Além de atuar potencializando o efeito do neurotransmissor inibitório GABA, pois estimula a ativação da enzima glutâmica descarboxilase (enzima envolvida na biossíntese do GABA), retarda seu metabolismo através da supressão da GABA-amino transferase e do succínato semialdeído desidrogenase, que metabolizam o GABA e aumenta a expressão dos receptores GABA, amplificando assim a resposta neuronal ao GABA (CASTRO *et. Al.*, 2007; MONTI *et. al.*, 2009; SINGH *et. al.*, 2021). Age na inibição de canais de cálcio e sódio (VANDONGEN *et. Al.*, 1986). Como também, possui ação sobre a inibição da histona deacetilase (HDAC) (SINGH *et. al.*, 2021). Um outro estudo provou que a supressão induzida por AVP da glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) e HDAC é responsável por seu efeito neuroprotetor em um modelo de isquemia cerebral de rato (SINGH *et. al.*, 2021; SILVA *et. al.*, 2018).

Embora o ácido valpróico (AVP) seja um medicamento aprovado para o tratamento de crises epilépticas, transtornos bipolares e enxaqueca (XIMENES *et al.*, 2015), vários estudos têm demonstrado que diferentes doses de ácido valpróico, tanto por via oral quanto por via intraperitoneal, têm o potencial efeito contra dores neuropáticas e neuropatia periférica (XIMENES *et. al.*, 2013; RODRIGUEZ-MENENDEZ *et. Al.*, 2008) e de melhorar o comprometimento cognitivo e outros sintomas relacionados a danos neuronais demonstrados por diferentes tipos de modelos de neuroproteção e doenças neurodegenerativas (SINGH *et. al.*, 2021; SILVA *et. al.*, 2018; XIMENES *et. al.*, 2015; CHU *et. al.*, 2015; MUANGSAB *et. al.*, 2019; MONTI *et. al.*, 2009) e de reperfusão isquêmica (Wang *et. Al.*, 2012). Exercendo, portanto, efeitos na melhoria da cognição e da memória, além de efeitos antiapoptóticos e antiinflamatórios (SINGH *et. al.*, 2021). Sendo importante mencionar que o ácido valpróico isoladamente, no presente estudo, não afetou os parâmetros de cognição.

O efeito protetor do AVP contra o comprometimento cognitivo induzido por cisplatina e o estresse oxidativo podem ser atribuídas às suas propriedades neuroprotetoras através da sua capacidade de reprogramar a expressão gênica por meio de hiperacetilação de histonas e relaxamento da cromatina devido a sua ação sobre a inibição da HDAC (SHARMA *et. al.*, 2019; PHIEL *et. al.*, 2001; SCNEIDER-STOCK, 2007; RODRIGUEZ-MENENDEZ *et. al.*, 2008;).

Conseguimos demonstrar, portanto, que o tratamento com cisplatina induziu déficits cognitivos e que a administração de AVP desde dois dias antes até dois dias depois de cada ciclo de cisplatina preveniu este efeito adverso, mesmo que parcialmente. Portanto, os resultados indicam um possível efeito protetor robusto para o ácido valpróico contra déficits cognitivos relacionados à cisplatina. Simultaneamente as alterações comportamentais, também foi encontrado aumento do dano oxidativo e diminuição da função colinérgica tanto no córtex pré-frontal, quanto no hipocampo no grupo de animais que receberam somente cisplatina (cisplatina + salina).

Uma revisão sistemática, Liu *et al* (2020), descreveu que o tratamento com AVP não apresentou efeito sobre a melhora cognitiva de pacientes com demência avançada por doença de alzheimer, porém, eles também descreveram que os pacientes do estudo já estavam em estágio muito avançado da doença e, portanto, já não teria como ser revertido. Além disso, os autores recomendam pesquisas em pacientes com comprometimento cognitivo leve ou em estágio inicial da demência.

Segundo NGUYEN *et. al* (2020), em sua revisão sobre os mecanismos do “chemobrain”, isto é, comprometimento cognitivo causado por quimioterapia, os sintomas do “chemobrain” são semelhantes ao envelhecimento normal, pois envolve uma perda sutil de funções, ou podendo ser comparável com estágios iniciais da doença de Alzheimer (AHLES *et al*, 2012). Inclusive, o próprio autor sugere que as drogas neurológicas existentes que visem mecanismos celulares relacionados ao “chemobrain” podem ser estudadas visando ser reaproveitados como tratamento (NGUYEN *et. Al*, 2020).

Dentre os possíveis mecanismos, demonstrados em estudos anteriores, envolvidos no “chemobrain” induzido por cisplatina estaria o aumento da atividade de HDAC6, potencializando a perda dendrítica pelo acúmulo de mitocôndrias danificadas, causando prejuízo cognitivo (NGUYEN *et. al*, 2020). Achados que corroboram e justificam os resultados encontrados na nossa presente pesquisa, de que o AVP é um possível fármaco para o tratamento/prevenção dos danos causados pela cisplatina no cérebro, já que um dos seus mecanismos de ação é a inibição das HDAC.

O córtex pré-frontal, o hipocampo e as estruturas extra-hipocampais tem importante papel na cognição, aprendizagem e funções de memória de roedores. Além disso, essas áreas são os alvos potenciais para os efeitos deletérios das drogas

anticancerígenas (MEHMET OZ *et. al*, 2015; SHABANI, LARIZADEH, *et al.*, 2012). Portanto, nosso estudo neuroquímico foi realizado no córtex pré-frontal e no hipocampo.

O sistema colinérgico central, particularmente no hipocampo, desempenha um papel fundamental indiscutível na regulação da aprendizagem e da memória, que são os principais constituintes do comportamento cognitivo (CHTOUROU *et al.*, 2015; BLOKLAND 1995). O hipocampo é um importante centro de plasticidade sináptica e sua atividade é amplamente modulada por outras regiões encefálicas, tais como a amígdala e os núcleos colinérgicos do septo medial e o núcleo basalis de Meynert (DIEH *et. al*, 2007; COYLE, 1983). Neurônios colinérgicos projetam-se para o hipocampo, neocórtex, partes do córtex límbico e amígdala, modulando as funções (ALBUQUERQUE, 2013). Diversas pesquisas ao longo dos anos têm demonstrado que o declínio das funções colinérgicas está envolvido na deterioração da cognição, em déficits cognitivos e na própria demência (BLOKLAND, 1995; GAUTHIER, 2002; 20 SERINIKI, VITAL, 2008; MEHMET OZ *et. al*, 2015). Portanto, avaliar a função colinérgica é um passo importante para estudar os efeitos de uma substância sobre a cognição e a memória.

Realizamos no presente estudo a avaliação do efeito da cisplatina na função colinérgica através da medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Observamos que a atividade da AChE foi aumentada no grupo cisplatina em comparação com os controles (salina, AVP25, AVP50). Nossos achados estão de acordo com vários estudos anteriores que descreveram resultados semelhantes, isto é, aumento da atividade cerebral da AChE (AGRAWAL, MISHRA, TYAGI, NATH E SHUKLA, 2010; KUHAD & CHOPRA, 2007; Lu *et al.*, 2014; RINWA, KAUR, JAGGI, & SINGH, 2010; SONG *et al.*, 2010; CHTOUROU *et. al*, 2015; ZHOU *et. al*, 2017).

No entanto, nos grupos expostos a cisplatina e tratados com AVP (AVP25+cis e AVP50+cis) nas doses de 25 ou 50mg/kg foi encontrado redução da atividade da AChE no córtex pré-frontal e no hipocampo. Em estudos anteriores encontramos resultados semelhantes, AVP também diminuiu a atividade da AChE em modelo animal de Alzheimer (SORIAL & SAYED, 2017). Mishra e Goel (2015), descreveram que em modelo de epilepsia em roedores, o tratamento com AVP reduziu o nível de acetilcolinesterase cortical e também reduziu o comprometimento da memória. De acordo com esses resultados, o AVP mostrou exibir um efeito neuroprotetor através da diminuição da atividade da AChE.

No tocante às alterações oxidativas, no presente trabalho, investigamos os efeitos do AVP sobre o estresse oxidativo induzido por cisplatina no córtex pré-frontal e hipocampo. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas fisiologicamente através do metabolismo celular, em concentrações moderadas e desempenham importantes papéis nos processos de sinalização celular, apoptose, expressão gênica e transporte iônico. Essas moléculas são rigidamente controladas por antioxidantes que podem agir de maneira direta, atuando como “scavenger” (sequestradores), ou de maneira indireta através do aumento da expressão de enzimas antioxidantes (LU et al., 2010). Porém, o excesso desses radicais resulta em estresse oxidativo, um processo deletério capaz de mediar danos a estruturas celulares, como lipídeos, proteínas e DNA (VALKO *et. al.*, 2007).

O estresse oxidativo pode afetar diversas funções biológicas regulares e desencadear efeitos neurotóxicos. Sendo um dos mecanismos mais importantes envolvidos na toxicidade da cisplatina, pois várias pesquisas demonstram que a cisplatina induz espécies reativas de oxigênio que desencadeiam disfunção mitocondrial, morte celular, além de danos ao DNA (TCHOUNWOU *et al.*, 2021; DASARI *et. al.*, 2014).

O tecido cerebral é rico em lipídios e proteínas, possui altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados e de ferro, que contribuem com a formação excessiva de radicais livres, é dependente de um ambiente rico em oxigênio para funcionar adequadamente, possui baixo poder de regeneração em comparação com outros tecidos em nosso corpo e, em relação a outros tecidos, tem uma menor quantidade de defesas antioxidantes, portanto, está mais vulnerável a danos oxidativos e nitrosativos (HALLIWELL, 2006; GARCIA, 2009; KUSHNAREVA; NEWMeyer, 2010). Assim, a melhora e/ou prevenção da neurotoxicidade é um importante questão para uma maior qualidade de vida dos pacientes (CHTOUROU *et. al.*, 2015).

Avaliamos alguns marcadores do estado oxidativo, como por exemplo, a quantificação dos níveis de TBARS (substâncias reativas de ácido tiobarbitúico), que é um importante indicador da peroxidação lipídica (PIRES *et. al.*, 2013; VALKO *et. al.*, 2007), foi aumentada de modo significativo em cérebros de ratos com o tratamento da cisplatina em relação ao grupo controle. Esse efeito foi revertido após o tratamento com AVP em todas as doses em todas as áreas testadas.

O óxido nítrico apresenta efeitos protetores, dilatando vasos e com isso aumentando a oferta de glicose e oxigênio, mas ao reagir com o radical superóxido forma o íon peroxinitrito, conduzindo a efeitos deletérios no tecido neuronal. Essa molécula é extremamente tóxica e danifica proteínas, lipídeos de membrana e DNA. De maneira indireta podemos quantificar a produção do NO através da dosagem de seu metabólito nitrito (VALKO *et. al*, 2007). Com relação às concentrações de nitrito, indicador indireto de estresse oxidativo, mostramos um aumento nos níveis de nitrito tanto no hipocampo, quanto no córtex pré-frontal. Estes efeitos foram revertidos pelo ácido valpróico neste protocolo experimental. O tratamento com AVP reverteu, mesmo que parcialmente, o aumento dos níveis de nitrito.

Portanto, os animais do grupo “cisplatina” apresentaram níveis significativamente elevados de nitrito e MDA tanto no hipocampo, quanto no córtex pré-frontal em relação ao grupo salina (controle). Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com ABDEL-WAHAB; MOUSSA (2019); ZHOU *et. al.* (2012); Lomeli *et al.* (2014); Chtourou *et. al* (2015) que em estudos anteriores encontraram resultados semelhantes, demonstrando papel importante do envolvimento dos níveis aumentados de EROS e ERN no mecanismo da neurotoxicidade por cisplatina. Efeitos que foram revertidos pelo ácido valpróico neste protocolo experimental, pois o tratamento com AVP tanto na dose de 50mg/kg e de 25mg/kg preveniu o aumento dos níveis de nitrito e MDA no hipocampo e córtex pré-frontal.

Monti *et. al.* (2009), descreveu em sua revisão que as propriedades de defesa contra o estresse oxidativo contribuem para o efeito neuroprotetor do AVP. Portanto, o AVP fornece neuroproteção contra danos causados por estresse oxidativo, inibindo a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas (WANG *et. Al*, 2004). Além disso, o AVP regula a expressão das três isoenzimas do glutathione S-transferase (GST M1, A3, A4), importante fatores contra o estresse oxidativo. Segundo FREY *et. Al*, (2006), AVP protege contra o estresse oxidativo induzido por anfetaminas *in vivo* e isso pode contribuir para o seu papel como drogas eficazes no tratamento de transtornos bipolares. Em termos mais gerais, a promoção de defesa antioxidante pode ser um mecanismo primário na base da neuroproteção do AVP. Estudos realizados com modelo de indução de mania por administração de ketamina, tanto o ácido valpróico como o lítio foram eficazes no controle dos níveis de TBARS, revertendo a hiperatividade induzida (GHEDIM, 2012).



A GSH (enzima glutatona) pode ser considerada um dos agentes mais importantes no sistema de defesa antioxidante da célula. Alterações na concentração de GSH estão envolvidas com diversas desordens fisiológicas (ZHU *et. al.*, 2018; HUBER *et. Al.*, 2008). Vários estudos relataram que a enzima glutatona (GSH), entre outras funções fisiológicas, está altamente envolvida na proteção cerebral contra EROS e que o comprometimento desta enzima tem sido correlacionado a várias doenças neurológicas (Barbosa *et. al.*, 2006; DRINGEN; HIRRLINGER, 2003).

Segundo Dasari *et. al.* (2014), o estresse oxidativo é a principal razão para a toxicidade induzida pela cisplatina, possivelmente devido a depleção da glutatona GSH reduzida (YILMAZ, IRAZ *et al.*, 2004). Moussa *et. al.* (2019), descreveu em seu estudo que a administração de uma dose única de cisplatina 8mg/kg foi capaz de causar redução de GSH em cérebro de ratos adultos. Em outro estudo foi relatado que o tratamento com cisplatina na dose de 5mg/kg/sem por cinco semanas consecutivas também reduziu significativamente os níveis de GSH em hipocampo de ratos adultos (CHTOUROU *et. al.*, 2015).

No presente estudo, analisou-se também a concentração de GSH (glutatona reduzida) no córtex pré-frontal e no hipocampo. A administração intraperitoneal de 5 mg/kg/sem reduziu significativamente e drasticamente o nível de GSH no córtex pré-frontal e hipocampo. Além disso, foi demonstrada que a atividade de GSH nos grupos Cis+AVP25 e CIS+AVP50, os quais receberam tratamento com AVP, houve aumento significativo dos níveis de GSH em relação ao grupo cisplatina, portanto, mesmo que parcialmente, o tratamento com AVP melhorou significativamente os níveis de GSH no córtex pré-frontal e hipocampo. Comparando o efeito das duas doses utilizadas no tratamento, a dose de 50mg/kg mostrou-se mais eficaz na melhora dos níveis de GSH no hipocampo, porém no córtex pré-frontal, não houve diferença nas duas doses utilizadas. Também é evidente que administração de AVP nas doses estudadas sem cisplatina não induziu uma mudança significativa no nível de GSH quando comparadas com o grupo salina (controle).

Foi descrito em estudos anteriores que, o tratamento crônico com AVP aumentou os níveis de glutatona e a expressão de glutamato-cisteína ligase (uma enzima que é um passo limitante para a síntese da taxa de glutatona) tanto em células corticais cultivadas de rato, quanto em linhagens celulares de neuroblastoma SH-SY5Y. O AVP

também inibiu a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio, em cultivo primário de célula cortical de ratos, através da regulação dos níveis de glutathione (CUI *et al.*, 2007; MONTI *et al.*, 2009).

Diversos estudos ao longo dos anos demonstraram que a cisplatina induz principalmente a morte celular por apoptose (DASARI *et al.*, 2014; TCHOUNWOU *et al.*, 2021). Em estudos anteriores foi descrito que a cisplatina danifica diretamente o DNA mitocondrial, levando à redução da capacidade respiratória mitocondrial (Lomeli *et al.*, 2017). Conseqüentemente, resultando em acúmulo de p53 mitocondrial e causando disfunção e anormalidades na estrutura mitocondrial (TCHOUNWOU *et al.*, 2021). A via p53 é uma rota de ativação de apoptose, ativada por dano ao DNA, com conseqüente ativação de Bax (proteína pró-apoptótica) e liberação do citocromo c pela mitocôndria (ADAMS & CORY, 2007).

A disfunção mitocondrial provoca um aumento no estresse oxidativo, que potencialmente inicia a via apoptótica intrínseca, via que é iniciada pelo aparecimento de “sinais de estresse” provenientes do interior da própria célula. Além disso, evidências experimentais demonstraram que a cisplatina se liga preferencialmente à proteína do canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), levando à liberação de citocromo c (MARULLO *et al.*, 2013).

A apoptose é um tipo controlado de morte celular que leva ao encolhimento, condensação de cromatina, brotamento de membrana, externalização de fosfatidilserina, e ativação de uma família de proteases de cisteína chamadas caspases (SALVESEN E DIXIT, 1997; CUMMINGS, LASKER *et al.*, 2000, DASARI *et al.*, 2014). A ativação da caspase é o passo chave no início da apoptose, e vários estímulos ativam caspases, incluindo aqueles que ativam receptores de morte na membrana plasmática ativando caspase 8 (via extrínseca) e os que geram disfunção mitocondrial ativando caspase 9 (via intrínseca) que, por sua vez, ativará a caspase 3, levando a segmentação do substrato da caspase que concluirá na apoptose da célula. (DASARI *et al.*, 2014).

As proteínas da família Bcl-2 regulam a apoptose induzida por danos no DNA, regulando a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e liberação de citocromo C mitocondrial em resposta a danos no DNA (DASARI *et al.*, 2014). Essa família, consiste em membros anti-apoptóticos, como o próprio Bcl-2 e pró-apoptóticos, como, entre outros, o Bax, que determinam a sobrevivência ou morte para a célula. A

proteína Bcl-2 inibe a apoptose diretamente bloqueando as Caspases, e indiretamente impedindo a liberação de citocromo C (FARIA *et. al.*, 2006).

Em um estudo anterior, realizado por Manohar *et al* (2014), uma única dose de cisplatina a 12 mg/kg induziu a transcrição de genes pró-apoptóticos, em um modelo com ratos. Dentre esses cinco genes está Card6, associado ao recrutamento de caspases e à formação de apoptossomos (BOUCHIER-HAYES E MARTIN, 2002), resultando em declínio na neurogênese (MANOHAR *et al.*, 2014). Segundo LOMELLI *et. Al* (2014), descreveu em seu estudo que o tratamento agudo com cisplatina (6 mg/kg) reduziu a ramificação e a densidade dos neurônios piramidais na região CA3 e que o tratamento por 4 semanas com cisplatina 5mg/kg/sem gerou extensa apoptose nas regiões CA1, CA3 e giro denteado no hipocampo de ratos.

Nesse contexto, os achados do presente estudo são compatíveis com achados prévios, já que a apoptose é descrita como um dos mecanismos de neurotoxicidade da cisplatina em estudos anteriores (DASARI *et. al.*, 2014; TCHOUNWOU *et al.*, 2021). Portanto, conseguimos demonstrar que a cisplatina conseguiu aumentar a expressão de caspase 3 clivada nas regiões hipocâmpais CA2 e giro denteado, como também reduziu a expressão de BCL2 nas regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo. No entanto, no grupo Cis+AVP50 foi possível observar que o tratamento com o AVP na dose de 50mg/kg foi capaz de reverter, mesmo que parcialmente, os efeitos da cisplatina na expressão de caspase 3 e BCL2 em algumas regiões. Pois, na região CA2 houve redução significativa da expressão de caspase 3 em relação ao grupo cisplatina e em relação a expressão de BCL2, houve aumento nas regiões CA2 e CA3 também em relação ao grupo cisplatina.

Estudo realizado anteriormente demonstrou que o tratamento com AVP protegeu os neurônios hipocâmpais normais e não as células cancerosas da citotoxicidade induzida por radiação tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além de ter favorecido o aumento da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e a redução da proteína pró-apoptótica Bax, como também, inibiu as atividades da histona desacetilase (HDAC) e da glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), sendo que a última só foi inibida em células normais (THOTALA *et. Al.*, 2015).

Segundo Hernandez *et. Al* (2015), AVP apresentou ação neuroprotetora contra lesão de isquemia-reperfusão em cérebro de ratos, alterou a expressão de Bcl2 e inibiu a ativação da caspase-3, que pode ser um mecanismo protetor do AVP contra a apoptose em neurônios lesionados (DHIRENDRA *et. al.*, 2021). Em outro estudo com

modelo de Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA o AVP foi capaz de reverter a neurotoxicidade e suprimir a produção de EROS intracelular, controlar a apoptose inativando as caspases 3, 7 e 9, como também reequilibrou a razão Bax/Bcl2 (HSU *et. al.*, 2020).

As mitocôndrias são organelas intracelulares que possuem um papel crucial na produção de ATP, uma molécula que é o principal combustível celular para a maioria dos processos que necessitam de energia. A principal via de produção de ATP é através da fosforilação oxidativa mitocondrial, sistema formado por diversas etapas de complexas reações enzimáticas (PEIXOTO *et.al*, 2009; SOUZA *et.al*, 2012). Sabe-se que o sistema de fosforilação oxidativa gera radicais livres, que em condições normais, a homeostase redox celular é preservada pelos sistemas antioxidantes. Porém em situações danosas que possam gerar mau funcionamento da cascata bioquímica e conseqüentemente disfunção mitocondrial, resulta-se em aumento na geração de radicais livres, estresse oxidativo, alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de citocromo C, comprometendo, portanto, a homeostase celular (LEHNINGER, NELSON E COX, 2017; SPINELLI E HAIGIS, 2018).

Por estar próximo da cadeia transportadora de elétrons, o DNA mitocondrial é um alvo fácil para os danos, gerando, portanto, episódios que se tornam um ciclo vicioso: a lesão do DNA mitocondrial que afetaria a função da cadeia respiratória, levando à geração de mais radicais livres que, por sua vez, provocariam lesão adicional ao DNA mitocondrial. Essas alterações mitocondriais são alvos centrais no processo de morte neuronal (SILVESTRE, 2013; SILVA *et. al.*, 2011; BANDY; DAVISON, 1990).

O intumescimento mitocondrial é considerado o principal fator gerador de apoptose mediada por mitocôndrias e morte celular por necrose (JAVADOV, CHAPADUBOCQ, MAKAROV, 2018). Esse fenômeno é gerado pela alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial, mediada pela abertura de poros específicos (PTP – poros de transição da permeabilidade) é um fenômeno induzido por uma resposta mitocondrial a estresses celulares, como à sobrecarga da concentração excessiva de cálcio (KOWALTOWSKI *et. al.*, 2019) associado ao acúmulo de EROS (espécies reativas de oxigênio) (ARAUJO *et. al.*, 2022; RAO *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2021), gerando intumescimento osmótico mitocondrial, promovendo descontinuação da fosforilação oxidativa, inchaço da matriz com remodelação da membrana interna e, em última instância, ruptura da membrana externa com liberação de citocromo c e outras proteínas apoptogênicas. Portanto, o PTP desempenha um papel crucial nas alterações da estrutura

e função das mitocôndrias, e assim, é considerado um evento relevante envolvido na perda/lesão neuronal e uma estratégia interessante para a neuroproteção (ARAÚJO *et al.*, 2022; RAO *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2021).

No presente estudo, realizamos pela primeira vez, a avaliação do efeito da cisplatina sobre o intumescimento mitocondrial (swelling mitocondrial) e analisamos também o efeito do AVP sobre a ação tóxica da cisplatina no intumescimento mitocondrial, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em cérebro de ratos. Primeiramente mostramos que a cisplatina induz intumescimento das mitocôndrias cerebrais a partir da concentração 1ng e que o AVP nas concentrações de 50 e 100 ng foi capaz de reverter os efeitos tóxicos da cisplatina sobre a membrana mitocondrial.

Ao realizarmos a análise *in vivo* observamos que, assim como *in vitro*, o AVP na dose de 50mg/kg conseguiu reverter os efeitos tóxicos da cisplatina sobre a membrana mitocondrial. Esses dados enfatizam a importância do AVP na proteção dos danos mitocondriais gerados pelo tratamento com cisplatina. Além disso, avaliamos também o efeito da cisplatina sobre o consumo de oxigênio nas mitocôndrias cerebrais de ratos e os efeitos do AVP sobre a ação da cisplatina.

Em uma revisão sobre os mecanismos moleculares da cisplatina, foi descrito que a cisplatina causa depleção de GSH e NADH, desequilíbrio da homeostase do cálcio intracelular, iniciando eventos primários como a peroxidação lipídica e inibição enzimática. Eventos que danificam as células através de dano mitocondrial, inibição da função mitocondrial, depleção de adenosina trifosfato (ATP) e outros cofatores. Levando provavelmente a apoptose ou a necrose tecidual (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

Diversos autores descreveram que a disfunção mitocondrial é considerada um dos principais mecanismos da neurotoxicidade causada por cisplatina (TCHOUNWOU *et al.*, 2021). CHIU *et al.* (2017) mostrou que a cisplatina afeta as mitocôndrias sinaptossomais levando à disfunção mitocondrial, o que ocorre em adição à interrupção do processo compensatório do transporte axonal, resultando no acúmulo de mitocôndrias danificadas, como também, aumento dos níveis de p53 mitocondrial cerebral. Outras evidências experimentais demonstraram que a cisplatina danifica diretamente o mtDNA e leva à redução da capacidade respiratória mitocondrial em células-tronco neuronais isoladas de rato (NSCs) e em neurônios de hipocampo de ratos (LOMELI *et al.*, 2017).

Um estudo prévio de vitrostomia revelou que a cisplatina se liga preferencialmente com mtDNA, levando a mtDNA defeituoso, ligando-se preferencialmente a proteínas mitocondriais, especialmente VDAC (LOMELI *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2006). Observado em microscopia eletrônica, as alterações ultraestruturais, assim como a degradação nas mitocôndrias são evidentes 4 horas após o tratamento com cisplatina 50  $\mu\text{mol/l}$  sugerindo, portanto, que as mitocôndrias podem ser o alvo principal da citotoxicidade por cisplatina (YANG *et al.*, 2006).

Em cultivo primário de células corticais de rato, AVP inibiu significativamente o aumento de cálcio induzido por glutamato, a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas, a fragmentação de DNA e a morte celular, sugerindo portanto, uma correlação precisa entre neuroproteção, redução da oxidação e consequente redução ao insulto excitotóxico (SHAO; YOUNG; WANG, 2005). Estudos mais recentes apontam que devido a ação do AVP no bloqueio das histonas deacetilases (HDACs), leva à ativação transcricional de vias antiapoptóticas, a supressão de caspase-3, de citocinas pró-inflamatórias, inibição da GSK3, redução da produção de EROS e redução da excitotoxicidade por glutamato (associado à falha na manutenção da homeostase do cálcio, disfunção mitocondrial e produção de EROs). (SINGH *et al.*, 2021; SONG *et al.*, 2021), contribuindo, portanto, com a homeostase mitocondrial e com seu papel como neuroprotetor.

Um estado energético celular anormal pode levar à perda da função e da plasticidade neuronal e, conseqüentemente, a alterações cognitivas e comportamentais (VALVASSORI *et al.*, 2010). O neurônio necessita de grande quantidade de energia para manter o equilíbrio intracelular de íons contra o gradiente de concentração, sendo que os processos via  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase situadas na membrana são os que mais gastam energia em células excitáveis (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017; NICHOLLS & BUDD, 2000). Entretanto, a diminuição da produção de ATP, ou seja, metabolismo energético celular anormal, pode causar efeitos danosos, incluindo déficits nos mecanismos envolvidos no tamponamento do cálcio, geração de espécies reativas de oxigênio e apoptose (BABCOCK & HILLE, 1998; GREEN & REED, 1998; VALVASSORI *et al.*, 2010). Conseqüentemente, o dano mitocondrial pode promover o entendimento de vários mecanismos fisiopatológicos na neurotoxicidade por cisplatina (DASARI *et al.*, 2014; TCHOUNWOU *et al.*, 2021).

Em relação ao consumo de oxigênio cerebral, realizamos a medida estimulada por succinato ou por malato mais glutamato, no estado 3 (quando ADP foi adicionado

para induzir fosforilação) e no estado 4 (quando a ATP sintase foi inibida por oligomicina). Conseguimos demonstrar, portanto, que a cisplatina reduziu o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias tanto em succinato, quanto em malato mais glutamato no estado 3 e que, notavelmente o AVP conseguiu reverter os efeitos da cisplatina no consumo de oxigênio no estado 3, com succinato ou com malato+glutamato como substratos.

Além disso, observamos que no estado 4, embora o tratamento com AVP em cérebros de ratos expostos a cisplatina não desencadeou nenhuma grande melhora no consumo de oxigênio, tanto em succinato, quanto em malato mais glutamato, os valores ficaram próximos aos do grupo salina. Portanto que o AVP apresentou um resultado benéfico, indicando um efeito neuroprotetor.

Ao analisarmos a razão de controle respiratório (RCR), que corresponde ao acoplamento entre respiração e a síntese de ATP (medido no estado 3/estado 4), vimos que a cisplatina, assim como esperado, afetou a RCR e portanto, reduziu esse parâmetro em relação ao grupo salina. Porém, notavelmente, o AVP também conseguiu reverter essas alterações.

Valvassori *et. al* (2010), conseguiu demonstrar em seu estudo sobre a atividade da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos submetidos ao tratamento com o agente pró-maníaco d-AMPH d-anfetamina (d- AMPH) que o AVP conseguiu reverter e prevenir a disfunção dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial induzida por d-AMPH no hipocampo, estriado e pré-frontal, corroborando, portanto, com nossos resultados.

## 7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, o AVP foi capaz de prevenir o comprometimento da aprendizagem e da memória induzido pela exposição a cisplatina. Portanto, demonstramos que o AVP protege contra deficiências induzidas por cisplatina na função cognitiva. Nas doses estudadas e durante o tempo administrado o AVP não contribuiu e nem causou alteração tóxica hepáticas e renal importantes, dado avaliado através de marcadores bioquímicos. Em relação aos parâmetros hematológicos, apenas no número de plaquetas, provavelmente, o AVP contribuiu com a alteração, porém não houve aumento significativo em relação ao grupo tratado somente com cisplatina.

Na avaliação da evolução de peso o AVP apresentou efeito benéfico favorecendo uma menor perda de peso, como também, reduziu a mortalidade dos animais tratados com cisplatina.

Complementando os resultados comportamentais, conseguimos demonstrar que o AVP conseguiu causar uma diminuição da atividade da AchE em hipocampo de ratos tratados com cisplatina. Como também, reverteu ou preveniu o aumento dos níveis de nitrito e MDA no hipocampo e córtex pré-frontal nas doses estudadas e reduziu também significativamente e drasticamente o nível de GSH no córtex pré-frontal e hipocampo.

Em relação ao estudo da apoptose, AVP conseguiu reduzir expressão de caspase 3 na região hipocampal CA2 e aumentar a expressão de BCL2 nas regiões hipocampais CA2 e CA3. Demonstramos também que AVP reverteu os danos na membrana mitocondrial tanto *in vitro* quanto *in vivo* causados pela cisplatina e que proporcionou uma melhora no consumo de oxigênio e RCR.

Esses achados são clinicamente relevantes devido à crescente evidência de que os pacientes tratados para câncer com compostos à base de platina frequentemente desenvolvem comprometimento cognitivo e anormalidades estruturais no cérebro.

A disponibilidade de uma droga, já usada há décadas na clínica, sabidamente segura, bem tolerada e barata, para proteger contra os efeitos deletérios da quimioterapia com compostos a base de platina, seria de grande benefício para os pacientes, visto que poderia aumentar sensivelmente sua adesão a terapia e, conseqüentemente, melhores resultados e melhora na qualidade de vida poderiam ser alcançados.



## 8- REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, W. M; MOUSSA, F. I. Neuroprotective effect of *N*-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. **Drug Des Devel Ther.** v. 11, n. 13, p. 1155-1162, 2019.

ABDEL-WAHAB, W. M; MOUSSA, F. I. Neuroprotective effect of *N*-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, n. 13, p. 1155-1162, 2019.

ACHARYA, S; BUSSEL, J. Hematologic Toxicity of Sodium Valproate. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 22, Issue 1 - p 62-65, 2000.

ADAMS, J. M; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324-37, 2009.

AHLES, T. A, SAYKIN, A. J. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. **Nat Ver Cancer**, v. 7, p. 192–201, 2007.

ALBERS, J. W, et al. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 2, p. 1–49, 2011.

ALBUQUERQUE, M. S de. **Caracterização da memória e de marcadores colinérgicos ao longo do envelhecimento de ratos.** Dissertação de Mestrado. USP – Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo 2013.

ALMUTAIRI, M. M et al. Neuro-protective effect of rutin against cisplatin-induced neurotoxic rat model. **BMC Complement Altern Med.** v. 17, n. 1, p. 472, 2017.

AMIDI, A et al. Changes in Brain Structural Networks and Cognitive Functions in Testicular Cancer Patients Receiving Cisplatin-Based Chemotherapy. **J Natl Cancer Inst.** v. 09, n. 12, 2017.

ANDRADE, V. M.; SANTOS, F. H.; BUENO, O. F. A. **Neuropsicologia hoje.** São Paulo, SP: Artes Médicas, 2004.

ANTONIUK, S. A et al. Insuficiência aguda hepática associada ao ácido valpróico na infância. Relato de três casos. **Arq Neuropsiquiatry**, v. 54, n. 4, p. 652-4, 1996.

ARAÚJO, L. L et al. Effects of vitamin D (VD3) supplementation on the brain mitochondrial function of male rats, in the 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. **Neurochem Int.** v. 154:105280, 2022.

BABU, E et al. Cisplatin induced nephrotoxicity and the modulating effect of glutathione ester. **Mol. Cell. Biochem.** v. 144, n.1, p. 7–11, 1995.

BABCOCK, D.F; HILLE, B. Mitochondrial oversight of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 8, p. 398–404, 1998.

- BADDELEY, A. D; HITCH, G. (1974). **Working Memory**. Em: Bower, G.A. (Ed). Recent advances in learning and motivation. New York: Academic Press.
- BADDELEY, A; EYSENCK, M; ANDERSON, M. Memória. Ed.Porto Alegre: Artmed, 2011.
- BADDELEY. Working Memory: Theories, Models, and Controversies. **Annual Review of Psychology**, v. 63, p.1-29, 2012.
- BADDELEY; A. EYSENCK, M. A., M. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2011
- BANDY, B; DAVISON, A, J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implication for carcinogenesis and aging? **Free Radic Biol Med**. v. 8, p. 523-39, 1990.
- BARBOSA, L. F et al. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova** [online]. v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006. [Acessado 21 maio 2022]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600034>>.
- BEAR, M. F; CONNORS, B. W; PARADISO, M. A. Neurociências - Desvendando o Sistema Nervoso. 4ª Edição, Artmed, 2017.
- BELCASTRO, V et al. Metabolic and endocrine effects of valproic acid chronic treatment. **Epilepsy Res**. v. 107, n. 1-2, p. 1-8, 2013.
- BHALCHANDRA, W; ALQADHI, Y. A; NINAWA, A. S. Ameliorative role of bee honey and royal jelly against cisplatin induced alteration in hematological parameters in male wister albino rat. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 110, 2018
- BIESTERVELD, B. E et al. Dose optimization of valproic acid in a lethal model of traumatic brain injury, hemorrhage, and multiple trauma in swine. **J Trauma Acute Care Surg**. v. 87, n. 5, p. 1133-1139, 2019.
- BIESTERVELD, B. E et al. Valproic Acid Protects Against Acute Kidney Injury in Hemorrhage and Trauma. **J Surg Res**. v. 266, p. 222-229, 2021.
- BIRLE, C, et al. Cognitive function: holarchy or holacracy? **Neurol Sci.**, v. 42, n. 1, p. 89-99, 2021.
- BITON, V et al. Lamotrigine Versus Valproate Monotherapy—Associated Weight Change in Adolescents With Epilepsy: Results From a Post Hoc Analysis of a Randomized, Double-Blind Clinical Trial. **Journal of Child Neurology.**, v. 18, n. 2, p. 133-139, 2003.
- BORTOLINI, L. G. C; KULAK, C. A. M.; BOGUSZEWSKI, C. L. Efeitos Endócrinos e Metabólicos dos Antiepilépticos. **J. epilepsy clin. neurophysiol.** v. 14 (suppl 2), 2008.
- BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: I situational factors. **Brit. J. Psychol.**, v. 48, p. 1-12, 1957.

BURTON, B. S. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. **Am Chem J3**: 385–395, 1882. In: LÖSCHER W. The discovery of valproate. In: Löscher W (eds) Valproate. Milestones in Drug Therapy. Birkhäuser, Basel, 1999.

BRUNTON, Laurence L. (Org.). **As Bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 13. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019 ISBN 9788580556148.

CALABRESE, J. R.; DELUCCHI, G. A. Phenomenology of rapid cycling manic depression and its treatment with valproate. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 50, (supplement), p. 30–34, 1989.

CARRAZ, G et al. Communication it propos des premiers essais cliniques sur l'activite anti-epileptique de l'acide n-dipropylacetiques (sel de Na). **Ann Med Psychol (Paris)** v, 122, p. 577 -585, 1964.

CASTRO, L. A.; COUZI, C. U. Potencial dos anticonvulsivantes no tratamento ambulatorial da dependência de álcool. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria** [online]. v. 55, n. 3, 2006. [Acessado 14 Maio 2022], pp. 212-217. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0047-20852006000300007>>.

CHATEAUVIEUX, S et al. Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

CHATEAUVIEUX, S. F; MORCEAU, M. DICATO, M. Diederich Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, 2010.

CHEN, P. S et al. Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. **Neuroscience**, v. 149, n. 1, p. 203–212, 2007.

CHEN, S et al. Valproic acid: a new candidate of therapeutic application for the acute central nervous system injuries. **Neurochem. Res.** v. 39, n. 9, p. 1621–1633, 2014.

CHEN. P, S et al. Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 12, p. 1116–1125, 2006.

CHIU, G. S et al. Pifithrin- $\mu$  Prevents Cisplatin-Induced Chemobrain by Preserving Neuronal Mitochondrial Function. **Cancer Res.** v. 77, n. 3, p. 742-752, 2017.

CHIU, G. S. et al. Nasal administration of mesenchymal stem cells restores cisplatin-induced cognitive impairment and brain damage in mice. **Oncotarget**, v. 9, n. 85, p. 35581-35597, 2018.

CHO, J.-M.; MANANDHAR, S.; LEE, H.-R.; PARK, H.-M.; KWAK, M.-K. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. **Cancer Lett.**, v.260, n.1-2, p.96-108, 2008.

CHOI, S et al. Ginkgo biloba extracts protect auditory hair cells from cisplatin-induced ototoxicity by inhibiting perturbation of gap junctional intercellular communication. **Neuroscience**. Aug. v. 6, n. 244, p. 49-61, 2013.

CHTOUROU Y et al. Naringin Abrogates Cisplatin-Induced Cognitive Deficits and Cholinergic Dysfunction Through the Down-Regulation of AChE Expression and iNOS Signaling Pathways in Hippocampus of Aged Rats. **J Mol Neurosci**. v. 56, n. 2, p. 349-62. 2015.

CHU, T et al. Valproic acid-mediated neuroprotection and neurogenesis after spinal cord injury: from mechanism to clinical potential. **Regen Med**. v. 10, n. 2, p. 193-209, 2015.

COYLE, J. T; PRICE, D. L; DELONG M. L. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation, **Science**. v. 219, p. 1184-90, 1983.

CAPONIGRO F, DI GENNARO E, IONNA F, LONGO F, AVERSA C, PAVONE E, MAGLIONE MG, DI MARZO M, MUTO P, CAVALCANTI E, PETRILLO A, SANDOMENICO F, MAIOLINO P, D'ANIELLO R, BOTTI G, DE CECIO R, LOSITO NS, SCALA S, TROTTA A, ZOTTI AI, BRUZZESE F, DAPONTE A, CALOGERO E, MONTANO M, PONTONE M, DE FEO G, PERRI F, BUDILLON A. Phase II clinical study of valproic acid plus cisplatin and cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of Head and Neck-V-CHANCE trial. **BMC Cancer**. 2016 Nov 25;16(1):918.

CUI, J et al. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. **Neuroscience**, v. 144, 1447-1453, 2007.

CUMMINGS, B. S; LASKER, J. M; LASH, L. H. Expression of glutathione-dependent enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal tubular cells from human kidney. **J.Pharmacol.Exp.Ther**. v. 293, p. 677-685, 2000.

DASARI, S; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**. v. 740, p. 364-78, 2014.

DE ALBUQUERQUE, M. S. **Caracterização da memória e de marcadores colinérgicos ao longo do envelhecimento de ratos**. Dissertação de Mestrado. USP – Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo 2013.

DEWOSKIN, R. S; RIVIERE, J. E. Cisplatin-induced loss of kidney copper and nephrotoxicity is ameliorated by single dose diethyldithiocarbamate, but not mesna, **Toxicol. Appl. Pharmacol**. v. 112, p. 182-189, 1992.

DIAMOND, A. Activities and Programs That Improve Children's Executive Functions. **Current Directions in Psychological Science**, v. 21, n. 5, p. 335-341, 2012.

DIAMOND, A. Executive Functions. **Annual Review of Psychology**, v. 64, n. 1, p. 135-168, 2013.

DIAMOND, A. Executive Functions. **Annual Review of Psychology**, v. 64, n. 1, p. 135-168, 2013.

- DIEHL, F et al. Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task. **Behav Brain Res.** v. 177, n. 2, p. 227-31, 2007.
- DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, 2000.
- DUSSE, L. M. S et al. Biomarcadores da função renal: do que dispomos atualmente? **RBAC.** v. 49, n. 1, p. 41-51, 2017.
- EATON, D.C.; POOLER, J. P. **Fisiologia renal de Vander.** 8. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016. (Lange).
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav. Brain. Res.**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.
- FARIA, E. L. B; MOURÃO JÚNIOR, C. A. Os recursos da memória de trabalho e suas influências na compreensão da leitura. **Psicologia: Ciência e Profissão** [online]. 2013, v. 33, n. 2 [Acessado 16 Maio 2022], p. 288-303. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1414-98932013000200004>>.
- FARIA, M. H. G ET al. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** [online]. v. 42, n. 4, p. 271-278, 2006, [Acessado 21 Maio 2022]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1676-24442006000400008>>. Epub 22 Set 2006. ISSN 1678-4774.
- FERRER, I et al. Neurochemistry and the non-motor aspects of PD. **Neurobiology of Disease**, v. 46, issue 3, p.508-526, 2012.
- FREY, B. N et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **J. Psychiatry Neurosci.**, v. 31, p. 326-332, 2006.
- FRIIS, M. L. Valproate in the treatment of epilepsy in people with intellectual disability. **Journal of Intellectual Disability Research.** v. 42, (supplement 1), p. 32–35, 1998.
- GARCIA, J. M et al. Inhibition of cisplatin-induced lipid catabolism and weight loss by ghrelin in male mice. **Endocrinology**, v. 154, p. 3118–3129, 2013.
- GARCIA, R. C. T. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo: Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas), 2009.
- GIRIDHARAN, V. V et al. Schisandrin B, attenuates cisplatin-induced oxidative stress, genotoxicity and neurotoxicity through modulating NF-kappaB pathway in mice. **Free Radic Res.** v. 46, p. 50–60 2012.
- GO, H.S et al, Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF-κB signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL. **J. Biomed. Sci.** v. 18, n. 1, p. 48, 2011.

GOFF, D. A; PRATI, C; ONG, B. The relations between children's reading comprehension, working memory, language skills and components of reading decoding in a normal sample. **Reading and Writing**, v.18, p. 583-616, 2005.

GOLCHIN, L et al. Pistachio supplementation attenuates motor and cognition impairments induced by cisplatin or vincristine in rats. **Adv Biomed Res.** v. 4, p. 92, 2015.

GÖTTLICHER, M et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. **EMBO J.** v. 20, n. 24, 6969–6978, 2001.

GOTTLICHER, M. Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. **Ann Hematol.** v. 83(Suppl 1): S91–2, 2004.

GURPUR, P. B et al. Valproic acid activates the PI3K/Akt/mTOR pathway in muscle and ameliorates pathology in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, p. 999–1008, 2009.

GURVICH, N et al. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. **Cancer Res.** v. 64, p. 1079–86, 2004.

GREEN, D. R; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309–1312, 1998.

HAETTIG, J et al. HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)** v. 18, n. 2, p. 71–79, 2011.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HALLIWELL, B. Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. **Antioxid. Redox Signal**, v. 8, p. 2007-2019, 2006a.

HARRISON I. F; DEXTER, D. T. Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease? **Pharmacol. Ther.** v. 140, n. 1, p. 34–52, 2013.

HARRISON, I. F; ANIS, H. K; DEXTER D. T. Associated degeneration of ventral tegmental area dopaminergic neurons in the rat nigrostriatal lactacystin model of parkinsonism and their neuroprotection by valproate. **Neurosci. Lett.** v. 614, p. 6–23, 2016.

HASHEM, M. A e al. Alterations in hematological and biochemical parameters and DNA status in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma cells and treated with cisplatin and cyclophosphamide. **Comp Clin Pathol.** v. 29, p. 517–524, 2020.

HERNANDEZ, G. M; GARAY, F. J; LOUREIRO, N. E. Neuroprotective action of valproic acid accompanied of the modification on the expression of Bcl-2 and activated caspase-3 in the brain of rats submitted to ischemia/reperfusion. **Investig. Clin.** v. 56, n. 4, p. 377-388, 2015.

HINDUJA, S et al. D-Methionine Protects Against Cisplatin-Induced Neurotoxicity in the Hippocampus of the Adult Rat. **Neurotox Res.** v. 27, n. 3, p. 199–204, 2015.

HOCKLY, E et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 100, n. 4, p. 2041-2046, 2003.

HOSSEINIAN, S et al. The protective effect of *Nigella sativa* against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Avicenna J Phytomed.** v. 6, n. 1, p. 44-54, 2016.

HOYER, S.; LANNERT, H. Long-term abnormalities in brain glucose/ energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein. **J Neural Transm Suppl.** v. 72, p. 195–202, 2007.

HSU, S. W et al. Protective effects of valproic acid on 6-hydroxydopamine-induced neuroinjury. **Environ Toxicol.** v. 35, n. 8, p. 840-848, 2020.

HUBER, P. C et al. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova** [online]. v. 31, n. 5 pp. 1170-1179, 2008. [Acessado 21 Maio 2022], Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>.

HUO, X. J et al. Cisplatin treatment induces attention deficits and impairs synaptic integrity in the prefrontal cortex in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 17400, 2018.

HUSSEINI, M et al. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 5, p. 293-307, 2012.

IANNELLI F, ZOTTI AI, ROCA MS, GRUMETTI L, LOMBARDI R, MOCCIA T, VITAGLIANO C, MILONE MR, CIARDIELLO C, BRUZZESE F, LEONE A, CAVALCANTI E, DE CECIO R, IACHETTA G, VALIANTE S, IONNA F, CAPONIGRO F, DI GENNARO E, BUDILLON A. Valproic Acid Synergizes With Cisplatin and Cetuximab *in vitro* and *in vivo* in Head and Neck Cancer by Targeting the Mechanisms of Resistance. **Front Cell Dev Biol.** 2020 Aug 17;8:732.

ISERI, S et al. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. **Toxicology.** v. 230, p. 256–264, 2007.

IZQUIERDO, I. **Memória** (2. ed.). Porto Alegre, RS: Artmed, 2011.

JANELSINS, M. C et al. Prevalence, mechanisms, and management of cancer-related cognitive impairment. **Int Rev Psychiatry.** v. 26, p. 102–113, 2014.

.

JAVADOV, S; CHAPA-DUBOCQ, X; MAKAROV, V. Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling. **Mitochondrion.** v. 38, p. 58-70, 2018.

JOHANNESSEN, C. U; JOHANNESSEN, S.I. Valproate: past, present, and future. **CNS Drug Rev.** v. 9, n. 2, p. 199–216, 2003.

KANAI, H et al. Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. **The Pharmacogenomics Journal** v. 4, p. 336–344, 2004.

KIM, T et al. **HDAC inhibition by valproic acid induces neuroprotection and improvement of PD-like behaviors in LRRK2 R1441G transgenic mice.** *Exp. Neurobiol.*, v. 28, n. 4, p. 504-515, 2019.

KORZUS, E; ROSENFELD, M. G; MAYFORD, M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*, v. 42, n. 6, p. 961–972, 2004.

KUSHNAREVA, Y, NEWMAYER, D.D. Bioenergetics and cell death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 1201 p. 50-7. 2010.

KWON, N. S. et al. Nitric oxide generation from streptozotocin. *FASEB journal*, v. 8, n. 8, p. 529–533, 1994.

LEE, S. H et al. “Impaired short-term plasticity in mossy fiber synapses caused by mitochondrial dysfunction of dentate granule cells is the earliest synaptic deficit in a mouse model of Alzheimer's disease.” *The Journal of neuroscience*, v. 32, n. 17, p. 5953-63, 2012.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** Cap. 14, 16, 17, 19. Arned, 6. ed., 2014 (figuras) e W. H. Freeman and Company, 7. ed., 2017.

LENT, R. (Coord.) **Neurociência da mente e do comportamento.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios:** conceitos fundamentais de neurociência. 2ed. São Paulo, Editora Atheneu. 2010.

LIN, Y. C et al. Quercetin attenuates cisplatin-induced fat loss. *Eur J Nutr.* v. 60, n. 4, p. 1781-1793, 2021.

LIU J, WANG LN. Efficacy and safety of valproic acid in dementia: A systematic review with meta-analysis. *Arch Gerontol Geriatr.* v. 89, n. 2020104091, 2020.  
LIU, X. S et al. Zhang **Valproic acid increases white matter repair and neurogenesis after stroke.** *Neuroscience*, v. 220, p. p. 313-321, 2012.

LOMELI, N et al. Cisplatin-induced mitochondrial dysfunction is associated with impaired cognitive function in rats. **Free radical biology & medicine**, v. 102, p. 274–286, 2017.

LÖSCHER W. In vivo administration of valproate reduces the nerve terminal (synaptosomal) activity of GABA aminotransferase in discrete brain areas of rats. *Neurosci. Lett.* v. 160, n. 2, p. 177–180, 1993.

LU, J. P et al. The effects of suberoylanilide hydroxamic acid on cognitive performance and cerebral tau phosphorylation in Alzheimer's disease transgenic mice. **Chin J Neurol**, v. 45, n. 2, p. 102–106, 2012.



LUIRO, K. M., et al. Batten disease (JNCL) is linked to disturbances in mitochondrial, cytoskeletal, and synaptic compartments. **Journal of Neuroscience Research**, v. 84, n. 5, p. 1124-1138, 2006.

MANOHAR, S; JAMESDANIEL, S; SALVI R. Cisplatin inhibits hippocampal cell proliferation and alters the expression of apoptotic genes. **Neurotox Res.** v.25, n. 4, p. 369-80, 2014.

MARANHÃO, M. V. M; GOMES, E. A; CARVALHO, P. E. Epilepsia e anestesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia** [online]. v. 61, n. 2 [Acessado 4 Maio 2022] , pp. 242-254, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-70942011000200013>>.

MARK, R. J et al. Anticonvulsants attenuate amyloid beta-peptide neurotoxicity, Ca<sup>2+</sup> deregulation, and cytoskeletal pathology. **Neurobiol. Aging**. v. 16, n. 2, p. 187–198, 1995.

MARULLO, R et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. **PLoS One**, v. 8, n. 11, e81162, 2013.

MCELROY, S. L et al. Valproate in psychiatric disorders: literature review and clinical guidelines. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 50, (supplement), p. 23–29,1989.

MCWHINNEY, S. R; GOLDBERG, R. M; MCLEOD, H. L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. **Mol Cancer Ther.** v. 8, n. 1, p. 10–16, 2009.

MELLO, P. A et al. Nefrotoxicidade e alterações de exames laboratoriais por fármacos: revisão da literatura. **Rev Med (São Paulo)**. v. 100, n. 2, p. 152-61, 2021.

MESDJIAN, E; CIESIELSKI, L; VALLI, M. Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 6, n. 3, p. 223–233, 1982.

MEUNIER, H et al. Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique. *Ler Memoire: Propriétés antiepileptiques*. **Thérapie**, v. 18, p. 435-438, 1963.

MISHRA A, GOEL RK. Comparative behavioral and neurochemical analysis of phenytoin and valproate treatment on epilepsy induced learning and memory deficit: Search for add on therapy. *Metab Brain Dis.* 2015

MISHRA, J; CHAUDHARY, T; KUMAR, A. Rosiglitazone synergizes the neuroprotective effects of valproic acid against quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: targeting PPAR $\gamma$  and HDAC pathways. **Neurotox. Res.** v. 26, n. 2, p. 130–151, 2014.

MONTI B, POLAZZI E, CONTESTABILE A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. **Curr Mol Pharmacol.** v. 2, n. 1, p. 95-109, 2009.

MONTI, B et al. Alpha-synuclein protects cerebellar granule neurons against 6-hydroxydopamine-induced death. *Journal of Neurochemistry*, v. 103, n. 2, p. 518–530, 2007.

MORENO, R. A et al. Anticonvulsivantes e antipsicóticos no tratamento do transtorno bipolar. *J. Psychiatry*, v. 26, suppl 3, 2004.

MUANGSAB, J et al. **Protective effect of valproic acid on MPP+-induced neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells through Cdk5/p35/Erk signaling cascade.** *Trop. J. Pharm. Res.*, v. 18, p. 11, 2019.

MURPHY, M; RAJEEV, S; KEVIN, D. **Bioquímica clínica.** 6. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

NGUYEN, L. D, EHRLICH, B. E. Cellular mechanisms and treatments for chemobrain: insight from aging and neurodegenerative diseases. *EMBO Mol Med.* v. 12, n. 6, e12075, 2020.

OLATUNDE, O; ADEDARA, I. A., FAROMBI, E. O. Pretreatment with taurine prevented brain injury and exploratory behaviour associated with administration of anticancer drug cisplatin in rats. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 02, p. 375-384, 2018.

OLIVEIRA KA. **Modulação do sistema glutamatérgico por cisplatina em células de glioma humano e astrócitos corticais de ratos.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Neurociências. Florianópolis, 2013.

ONGNOK, B; CHATTIPAKORN, N; CHATTIPAKORN, S. C. Doxorubicin and cisplatin induced cognitive impairment: The possible mechanisms and interventions. *Exp Neurol.* v. 324, p. 113118, 2020.

OWOEYE, O; ADEDARA, I. A; FAROMBI, E. O. Pretreatment with taurine prevented brain injury and exploratory behaviour associated with administration of anticancer drug cisplatin in rats. *Biomed Pharmacother.* v. 102, p. 375–384, 2018.

OZ, M et al. Curcumin alleviates cisplatin-induced learning and memory impairments. *Neurobiol Learn Mem.* v. 123, p. 43-9, 2015.

PAN, T et al. Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells. *FEBS Letters*, v, 579, n. 30, 6716–6720, 2005.

PAROLIN, M. B; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares, *Arq. Gastroenterol.* v. 38, n. 2, 2001.

PEIXOTO, F.P. et al. Caracterização da mitocôndria isolada de fígado de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) e alterações da bioenergética mitocondrial causadas pela exposição herbicida oxifluorfena. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* [online], v. 61, n. 2, p. 386-392. 2009. [Acessado 21 Maio 2022]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000200015>>.

- PEREIRA, L. C. Mitocôndria como Alvo para Avaliação de Toxicidade de Xenobiótico, **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, n. 1-2, p. 1-14, 2012.
- PERES, L. A. B et al. Biomarcadores da injúria renal aguda. **Brazilian Journal of Nephrology** [online]. [Acessado 10 Maio 2022], v. 35, n. 3 p. 229-236, 2013, Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/0101-2800.20130036>>.
- PETERSON G.M., NAUNTON M. Valproate: a simple chemical with so much to offer. **J. Clin. Pharm. Ther.** v. 30, n. 5, p. 417–421, 2005.
- PHIEL, C. J et al. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. **J Biol. Chem.**, v. 276, p. 36734-36741, 2001.
- PIRES, L. F et al. Determinação dos níveis de malonaldeído e nitrito em indivíduos portadores de traço falciforme. **Revista De Ciências Médicas E Biológicas**, v. 12, n. 1, p. 65–69, 2013.
- RAO, V. K; CARLSON, E. A; YAN, S. S. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. **Biochim Biophys Acta.** v. 1842, n. 8, p. 1267-72, 2014.
- REN, M et al. Chuang. **Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction.** **J. Neurochem.**, v. 89, p. 6, p. 1358-1367, 2004.
- RODRIGUES M.A.C. **Avaliação da interferência do efeito antioxidante do carvedilol, um potencial agente nefroprotetor, na atividade antitumoral da cisplatina.** Tese doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2013.
- RODRIGUEZ-MENENDEZ, V et al. Valproate protective effects on cisplatin-induced peripheral neuropathy: an in vitro and in vivo study. **Anticancer Res.** v. 28, n. 1<sup>a</sup>, p. 335-42, 2008.
- ROMOLI, M et al. Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. **Curr Neuropharmacol.** v. 17, n. 10, p. 926–946, 2019.
- SADRI-VAKILI, G et al. Histones associated with downregulated genes are hypo-acetylated in Huntington's disease models. **Hum. Mol. genet.** v 16, n. 11, p. 1293-306, 2007.
- SALVESEN, G. S; DIXIT, V. M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v. 91, p. 443–446, 1997.
- SCHWARCZ, R.; BENNETT, J. P. JR.; COYLE, J. T. Inhibitors of GABA metabolism: implications for Huntington's disease. **Ann. Neurol.** v. 2, p. 299-303, 1977.
- SANTOS, N A G. **Efeito da cisplatina na função, estresse oxidativo e estado redox mitocondrial renal em ratos: efeito protetor da dimetiltiouréia.** Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 2006.

SCHWARCZ, R; BENNETT, J. P. JR.; COYLE, J. T. Inhibitors of GABA metabolism: implications for Huntington's disease. **Ann. Neurol.**, v. 2, p.299-303, 1977.

SCNEIDER-STOCK, R; OCKER, M. Epigenetic therapy in cancer: molecular background and clinical development of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors. **IDrugs**, v. 8, p. 557-561, 2007.

SEN, S et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity in mice: Protective role of *Leea asiatica* leaves. **Renal Failure**, v. 35, n. 10, p. 1412–1417, 2013.

SHABANI, M et al. Walnut consumption protects rats against cisplatin-induced neurotoxicity. **Neurotoxicology**. v. 33, n. 5, p. 1314-21, 2012.

SHARMA, S. K; SARATHLAL, K. C; TALIYAN, R. Epigenetics in neurodegenerative diseases: the role of histone deacetylases CNS Neurol. Disord. Drug Targets Former. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 18, n. 1, p. 11-18, 2019.

SILVA, M. R et al. Neuroprotective effects of valproic acid on brain ischemia are related to its HDAC and GSK3 inhibitions Pharmacol. Biochem. **Behav**, v. 167, p. 17-28, 2018.

SILVA, W. J. M; FERRARI, C. K. B, Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia** [online], v. 14, n. 3, p. 441-451 2011 [Acessado 21 Maio 2022]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1809-98232011000300005>>. Epub 24 Ago 2012. ISSN 1981-2256. <https://doi.org/10.1590/S1809-98232011000300005>.

SILVESTRE, F. **Avaliação da atividade antioxidante de compostos orgânicos de selênio sob parâmetros de dano oxidativo e mitocondrial em cérebro de ratos submetidos à sepse. Dissertação de mestrado.** UNISUL- Universidade Do Sul De Santa Catarina. Tubarão, 2013

SIMO, M et al. Chemobrain: a systematic review of structural and functional neuroimaging studies. **Neurosci Biobehav Rev**. 37: 1311–1321, 2013.

SINGH, D et al. Hidden pharmacological activities of valproic acid: A new insight. **Biomed Pharmacother**, v. 142, p. 112021.

SORIAL, M. E; EL SAYED, N. S. E. D. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 390, n. 6, p. 581-593, 2017.

SPINELLI, J; HAIGIS, M. The Multifaceted Contributions of Mitochondria to Cellular Metabolism. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 7, p. 745-754, 2018.

STEFANKO, D. P et al. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 23, p. 9447–9452, 2009.

TCHOUNWOU, P. B et al. Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy. **J Exp Pharmacol.** v. 13, p. 303-328, 2021.

THOTALA, D et al. Valproic acid enhances the efficacy of radiation therapy by protecting normal hippocampal neurons and sensitizing malignant glioblastoma cells. **Oncotarget**, v, 6, n. 33, p. 35004-22, 2015.

VALKO, M et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VALVASSORI, S. S, et al. Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine. **J Psychiatr Res.**, v. 44, n. 14, p. 903-9, 2010.

VAN BENEDEN, K et al. Comparison of trichostatin A and valproic acid treatment regimens in a mouse model of kidney fibrosis. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 271, p. 276–284, 2013.

VAN BENEDEN, K et al. Valproic acid attenuates proteinuria and kidney injury. **J Am Soc Nephrol.** v. 22, p. 1863–1875, 2011.

VANDONGEN, A; VANERP, M; VOSKUYL, R. Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance. **Epilepsia**, v. 27, n. 3, p. 177-182, 1986.

VARDY, J; TANNOCK, I. Cognitive function after chemotherapy in adults with solid tumours. **Crit Rev Oncol Hematol.** v. 63, p. 183–202, 2007.

VICHAYA, E. G et al. Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. **Front Neurosci.** v. 9, p. 131 2015.

WANG, F; AZZAM, E; YOUNG, T. Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. **Neuroscience**, v. 116, n. 2, p. 485-9, 2003.

WANG, J. F et al. Glutathione S-transferase is a novel target for mood stabilizing drugs in primary cultured neurons. **J. Neurochem.** v. 88, p.1477-1484, 2004.

WANG, Z et al. **Chronic valproate treatment enhances postischemic angiogenesis and promotes functional recovery in a rat model of ischemic stroke.** **Stroke**, v. 43, n. 9, p. 2430-2436, 2012.

WANG, Z et al. Valproic acid attenuates blood-brain barrier disruption in a rat model of transient focal cerebral ischemia: the roles of HDAC and MMP-9 inhibition. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 31, n. 1, p. 52–57, 2011.

WASEEM, M; PARVEZ, S. Mitochondrial dysfunction mediated cisplatin induced toxicity: Modulatory role of curcumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 334–342, 2013.

WAYKAR, B; ALQADHI, Y. A; NINAWA, A. S. ameliorative role of bee honey and royal jelly against cisplatin induced alteration in hematological parameters in male wister albino rat. International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, v. 10, n. 4, p. 110, 2018.

WEFEL, J. S; SCHAGEN S. B. Chemotherapy-related cognitive dysfunction. *Curr Neurol Neurosci Rep.* v. 12, p. 267–275, 2012.

WILLIAMS, A. M et al. Valproic acid improves survival and decreases resuscitation requirements in a swine model of prolonged damage control resuscitation. **J Trauma Acute Care Surg.** v. 87, n. 2, p. 393-401, 2019.

WINTERS, B. D.; SAKSIDA, L. M.; BUSSEY, T. J. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neurosci. Biobehav.**, v. 32, p. 1055–1070, 2008.

WIRZ, K.T et al. Early molecular changes in Alzheimer disease: can we catch the disease in its presymptomatic phase? **J Alzheimer's Dis.** v. 38, n. 4, p. 719–740, 2014.

WOLF, S et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. **Eur J Cancer**, v, 44, n. 11, p. 1507–1515, 2008.

XIAO, J. H et al. Cisplatin treatment induces attention deficits and impairs synaptic integrity in the pré-frontal cortex in mice. **Scientific Reports** v.8, n. 1. 2018.

XIMENES J. C et al. Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** v. 386, n. 7, p. 575–587, 2013.

XIMENES, J. C et al. Valproic acid neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is possibly related to its anti-inflammatory and HDAC inhibitory properties **J. Neurodegener. Dis.**, Article 313702, 2015.

YANG, Z et al. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. **Clin Cancer Res.**, v. 12, n. 19, p. 5817-25, 2006.

YAO, P.J et al. Kapogiannis Mitochondrial electron transport chain protein abnormalities detected in plasma extracellular vesicles in Alzheimer's disease **Biomedicines**, v. 9, p. 1587, 2021

ZÁDORI, D et al. Valproate ameliorates the survival and the motor performance in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Pharmacol Biochem Behav.* v. 94, n. 1, p. 148-53, 2009.

ZENG, Y et al. Changes in functional brain networks and neurocognitive function in Chinese gynecological cancer patients after chemotherapy: a prospective longitudinal study. **BMC Cancer.** v. 19, n 1, p. 386, 2019.

ZHOU, W; KAVELAARS, A; HEIJNEN, C. J. Metformin Prevents Cisplatin-Induced Cognitive Impairment and Brain Damage in Mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3: e0151890, 2016.

ZHU, M. M et al. The pharmacogenomics of valproic acid. **J Hum Genet.** v. 62, n. 12, p. 1009-1014, 2017.

ZHU, Z et al. Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis. **J Neurochem.** v. 144, n. 1, p. 93-104, 2018.