

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAREN FERREIRA DO NASCIMENTO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES OXIDATIVOS E CITOTÓXICOS INDUZIDOS PELA
QUIMIOTERAPIA EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA E OCORRÊNCIA DE
DÉFICIT DA FUNÇÃO EXECUTIVA.**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

CAREN FERREIRA DO NASCIMENTO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES OXIDATIVOS E CITOTÓXICOS
INDUZIDOS PELA QUIMIOTERAPIA EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA
E OCORRÊNCIA DE DÉFICIT DA FUNÇÃO EXECUTIVA**

Tese com objetivo de aprovação em doutorado em Medicina e Ciências da Saúde – Concentração em Neurociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Orientador: Professor Dr. André Luis Fernandes Palmi

Co-orientadora: Profesora Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Porto Alegre

2019

CAREN FERREIRA DO NASCIMENTO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES OXIDATIVOS E CITOTÓXICOS
INDUZIDOS PELA QUIMIOTERAPIA EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA
E OCORRÊNCIA DE DÉFICIT DA FUNÇÃO EXECUTIVA**

Trabalho de conclusão de doutorado
apresentado para à Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul – PUCRS como exigência parcial
para obtenção de título de doutorado em
Medicina e Ciências da Saúde.

Aprovado em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mirna Wetters Portuguez

Dra. Verônica Farina Azzolin

Dr. Daniel Prá

Agradecimentos

Minha imensa gratidão a todos que, à sua maneira, contribuíram para que este estudo pudesse ser concretizado.

À Clínica Viver, por possibilitar que minha pesquisa fosse conduzida com seus pacientes.

A Cinara, que acreditou e defendeu a minha ideia, e compreensivelmente me liberou todas as vezes, e foram muitas, para que me afastasse do trabalho e conduzisse este estudo com a seriedade que ele exigiu.

Às pacientes, que mesmo passando por um momento extremamente difícil de suas vidas, compreenderam a importância de sua colaboração no estudo conduzido, bem como o carinho por mim dispensado.

À equipe técnica da clínica, especialmente à enfermagem que, de forma incansável, se engajaram nesse propósito, sempre com muito amor e energia. Ainda, minha gratidão à equipe da farmácia e manipulação que sempre me acolheu e tanto fez para realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biogenômica da Universidade Federal de Santa Maria, pela parceria científica e competência técnica e humana. Ainda, viabilizando financeiramente a realização deste estudo.

Em especial e de maneira determinante, meu reconhecimento e gratidão à professora Ivana, que elegantemente apresentou-me um lado do “fazer ciência” que fez todo o sentido na minha profissão e certamente na minha vida. Uma cientista que me orgulho de ter trabalho em parceria.

Aos técnicos do laboratório, em especial a Verônica que, de maneira desprendida, recebeu incansavelmente as amostras de sangue sem empecilhos de hora ou dia da semana.

Obrigada Verônica por me mostrar o quanto a dedicação ao trabalho ainda vale a pena num país onde a pesquisa é tão difícil.

Ao Moisés, que muito nos ajudou na condução deste trabalho.

Ao professor Palmini, que aceitou o desafio de trabalhar comigo na área de psico-oncologia, proporcionando minha aproximação com a pesquisa de excelência.

Ao Eduardo, pela contribuição científica na análise de dados neuropsicológicos.

À CAPES, pelo incentivo acadêmico e financeiro deste projeto.

Ao seu Ervando e seu Nestor que com muito cuidado conduziram logisticamente as amostras até o laboratório de Biogenômica

À Nathália, minha querida sobrinha, que estendeu seu apoio científico e moral para minha conquista.

Ao Licerio, grande companheiro, que fez do meu desejo algo possível e real.

À minha mãe, que sempre acreditou no meu potencial e muitas vezes, esteve presente nesta jornada.

Por fim, mas sempre em primeiro lugar à Deus, energia que dá sentido a tudo.

Ficha Catalográfica

N244a Nascimento, Caren Ferreira do

Associação entre marcadores oxidativos e citotóxicos induzidos pela quimioterapia em mulheres com câncer de mama e ocorrência de déficit da função executiva / Caren Ferreira do Nascimento . – 2019.

111.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Fernandes Palmi.

Co-orientadora: Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

1. câncer de mama. 2. quimioterapia. 3. função executiva. 4. marcadores oxidativos. 5. marcadores citotóxicos. I. Palmi, André Luis Fernandes. II. Cruz, Ivana Beatrice Mânica da. III. Título.

RESUMO

A quimioterapia para câncer de mama pode induzir efeitos colaterais indesejáveis, como dificuldades cognitivas. Alterações cognitivas moderadas são relatadas em 15% a 50% dos sobreviventes de câncer de mama e até 75% podem apresentar alterações mais sutis. O presente estudo analisou, em mulheres em quimioterapia para câncer de mama, possível associação entre déficit executivo e marcadores oxidativos sanguíneos iniciais em resposta citotóxica imediata ao quimioterápico. Uma investigação longitudinal, prospectiva e translacional foi conduzida. Para medidas de funções executivas, foram aplicados testes neuropsicológicos, analisados pelo índice de RCI. Para obtenção de marcadores oxidativos e de expressão gênica, duas coletas de sangue foram realizadas. A comparação das variáveis qualitativas foi feita por teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, enquanto a comparação das variáveis quantitativas foi feita por teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Na condução deste estudo longitudinal foi confirmada a alta prevalência de indicadores de déficit executivo 78% das mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia. Mulheres com déficit executivo (DE) mostraram diminuição na viabilidade de PBMC. A análise da curva ROC mostrou que a lipoperoxidação (LP) poderia ser uma variável preditiva de desenvolvimento de declínio executivo (área na curva = 0,744). Mulheres com altas concentrações de LP (0,1 nmol MDA / mL sobrenadante) apresentaram risco para desenvolver DE 3,43 vezes maior (IC 95%: 1,22-9,68). Essa associação foi independente da idade, tratamentos quimioterápicos, ansiedade e depressão. Os níveis de dsDNA em CMSPs cultivados durante 24 horas foram significativamente maiores ($p=0,03$) em mulheres do grupo DE do que no grupo SDE. Níveis elevados de LP foram os que apresentaram um poder regular de predição de risco ao desenvolvimento de déficit executivo ($p=0,03$). Nossos resultados abrem perspectivas para análises complementares que confirmem a potencial associação entre os marcadores oxidativos e o desenvolvimento de déficit executivo.

Palavras-Chave: câncer de mama, quimioterapia, déficit executivo, marcadores oxidativos, lipoperoxidação

ABSTRACT

Chemotherapy for breast cancer may lead to undesirable cognitive side effects. Moderate cognitive abnormalities are seen in 15-50% of patients and up to 75% may report subtle changes. This study analyzed the possible association between executive dysfunction and early oxidative biomarkers related to the immediate cytotoxic reaction to chemotherapeutic regimens in a longitudinal, prospective fashion. Executive functions were probed through specific neuropsychological test and analyzed according to RCI criteria. Oxidative and gene expression biomarkers were analyzed in two consecutive blood samples. Qualitative and quantitative variables were compared through, respectively, Chi-square or Fisher's exact test, and the Wilcoxon-Mann-Whitney test. The study found that 78% of women with breast cancer undergoing chemotherapy had abnormalities in tests of executive function and these patients had reduced PBMC viability. ROC curves showed that lipoperoxidation (LP) could predict development of executive dysfunction (AUC 0.744). Women with high concentrations of LP (0,1 nmol MDA / mL) had almost 3.5 times the risk to develop executive dysfunction (CI 95%: 1,22-9,68), and this association was independent of age, type of chemotherapeutic regimen or scores of depression or anxiety. LP levels had moderate power of prediction of executive dysfunction (p 0.03). Furthermore, level of dsDNA cultivated during 24 hours in CMPS were significantly higher in women with executive dysfunction (p 0.03). The results of the present study open new avenues of evaluation of the risk of cognitive abnormalities, particularly executive dysfunction, through association with oxidative biomarkers.

Keywords: Breast cancer, chemotherapy, executive dysfunction, oxidative biomarkers, lipoperoxidation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Ação nas diversas fases do ciclo celular, dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama.
- Figura 2 Esquema geral do efeito de quimioterápicos no metabolismo oxidativo e inflamatório.
- Figura 3 Frequência de déficit executivo determinada pelo teste WCST em mulheres com câncer de mama no 2º e 4º ciclos de quimioterapia.
- Figura 4 Comparação da frequência de mulheres do grupo DE com superexpressão de genes de citocinas inflamatórias (> 1,5 vezes em relação ao grupo SDE) avaliada em culturas de 24 horas de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) obtidas de amostra de sangue após 4 horas da primeira administração do quimioterápico.
- Figura 5 Associação entre níveis elevados de lipoperoxidação (LP) em culturas de 24 h de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) obtidas de amostra de sangue de mulheres com câncer de mama após a 1ª exposição ao quimioterápico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência dos primers que serão utilizados para análise de expressão gênica.

Tabela 2 Características gerais das pacientes.

Tabela 3 Características Neuropsicológicas - Mudança Grupal.

Tabela 4 Reliable Change Index (RCI) - Mudanças Individuais.

Tabela 5 Mudança Clínica (mudança de classificação).

Principais escores do Teste Wisconsin de Classificação de Cartas como marcador
Tabela 6 de função executiva em mulheres com câncer de mama durante a realização do 2º e 4º ciclos de quimioterapia.

Comparação de modulação de variáveis oxi-inflamatórias entre mulheres com e
Tabela 7 sem déficit executivo (DE e SDE) determinado pelo WCST ao longo do 2º e 4º ciclos de quimioterapia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ACTH	Hormônio adrenocorticotropic
AUC	Área sobre a Curva
BAI	Inventário de Ansiedade de Beck
BDI-II	Inventário de Depressão de Beck – II
BRCA1	<i>Breast Cancer 1, early onset</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
CA	Categorias Completadas
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CIRC	Comprometimento Cognitivo Relacionado ao Câncer
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CLIS	Carcinoma Lobular <i>in situ</i>
CMF	Ciclofosfamida + Metotrexato + Fluoracil
CP	Carbonilação de Proteínas
CPMS	Células Periféricas Mononucleares do Sangue
CTCs	Células-tronco Cancerígenas
CVS	<i>Comma-separated values</i>
DAMPs	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i>
DCFH-DA	Diclorofluoresceína Diacetato
DE	Déficit Executivo
DHA	Ácido docosahexaenóico
DHEA	Hormônio desidroepiandrosterona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
dsDNA	<i>Double-Stranded DNA</i>
EC	Epirrubicina + Ciclofosfamida
EDTA	Ácido Eilenodiamino Tetra-acético
EGFR	Gene Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

EPA	Ácido eicosapentaenoico
ER	Receptor de Estrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAC	Fluorouracil + Doxorrubicina + Ciclofosfamida
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
FDG-PET	Fluorodesoxiglicose – Tomografia por Emissão de Pósitrons
FE	Funções Executivas
FISH	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
fMRI	Ressonância Magnética Funcional
G	Gap
HER2	Fator de Crescimento Epidérmico Humano
IBC	Câncer de Mama Inflamatório
IFN γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki-67	Antígeno 67
LP	Lipoperoxidação
M	Mitose
M	Média
M1	Macrófago 1
M2	Macrófago 2
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
MTT	Ensaio do 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-dipheny tetraoliumbromide
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
PE	Erros Perseverativos
PR	Receptor de Progesterona
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RCI	índice de Mudança Confiável
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
S	Síntese
SDE	Sem Déficit e Executivo
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TAC	Docetaxel + Doxorubicina + Ciclofosfamida
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TC	Docetaxel + Ciclofosfamida
TCH	Docetaxel + Carboplatina + Trastuzumab
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNBC	Câncer de Mama Triplo-negativo
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNM	Tamanho-Linfonodos-Metástase
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
WAIS	Escala de Inteligência Wechsler para Adultos
WCST	Teste Wisconsin de Classificação de Cartas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Aspectos epidemiológicos do câncer de mama.....	4
2.2 Aspectos biológicos do câncer de mama.....	4
2.3 Fases da carcinogênese.....	5
2.4 Genes associados ao câncer de mama e seu papel diagnóstico.....	6
2.5 A quimioterapia no câncer de mama.....	
2.6 Quimioterapia no câncer de mama e o declínio cognitivo.....	11
2.7 Potenciais mecanismos causais na indução do declínio cognitivo pela quimioterapia.....	15
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. HIPÓTESES.....	20
5. MÉTODOS.....	21
5.1 Delineamento do estudo.....	21
5.2 População e amostra.....	21
5.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	22
5.4 Instrumentos de coleta de dados.....	22
5.4.1 Avaliação geral do voluntário.....	22
5.5 Instrumentos de coleta e processamento do sangue.....	22
5.5.1 Análises laboratoriais dos marcadores bioquímico-moleculares.....	22
5.5.2 Cultura celular in vitro e análise da atividade mitocondrial e viabilidade celular.....	23
5.5.3 Quantificação de indicadores oxidativos.....	24
5.5.4 Análise de expressão gênica de citocinas inflamatórias.....	24
5.6 Instrumentos de medidas neuropsicológicas.....	25
5.6.1 Inventário de Ansiedade de Beck (BAI).....	25
5.6.2 Inventário de Depressão de Beck II (BDI-II).....	25
5.6.3 Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (WCST).....	26
5.6.4 Escala (WAIS): Subteste Dígitos.....	27
5.6.5 Escala (WAIS): Subteste Procurar Símbolos.....	27
5.7 Aspectos éticos.....	28
5.8 Análise estatística.....	28
6. RESULTADOS.....	31
7. DISCUSSÃO.....	39
8. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXOS.....	58
Anexo 1 - Aprovação do CEP.....	58

Anexo 2 - Aprovação da Submissão.....	63
Anexo 3 - Artigo	65

INTRODUÇÃO

O câncer exerce grande impacto no perfil epidemiológico da população global, sendo que no sexo feminino, o câncer de mama é o mais prevalente, atingindo 2,1 milhões de mulheres a cada ano e também causando o maior número de mortes relacionadas a esta doença (INCA, 2018; WHO, 2018). Em geral, as causas do câncer são multifatoriais e inter-relacionadas, via desestabilização da ordem e do funcionamento biológico do organismo, a partir de mudanças induzidas ativamente por mutações gênicas cumulativas. Tais mutações alteram a dinâmica da taxa de proliferação celular e indução de apoptose levando a estados celulares indiferenciados e imortalizados. Aproximadamente 90% dos casos de câncer estão ligados a fatores ambientais e comportamentais, incluindo estilo de vida, poluição, fatores socioeconômicos e culturais associados ao estresse psicossocial. Por outro lado, cerca de 10% dos cânceres estão associados a fatores hereditários (INCA, 2018; NARDIN, 2013; WHO 2018). Esta neoplasia representa um grupo heterogêneo de doenças com comportamento clínico altamente variável, uma vez que ocorre uma diversidade de genes envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama (ALI et al., 2014).

Atualmente, os tratamentos utilizados no câncer de mama envolve quimioterapia. Isto porque, os quimiofármacos possuem efeito sistêmico no combate às células tumorais, afetando diretamente a taxa de proliferação celular e apoptose via modulação do ciclo celular. Para tanto, os agentes quimioterápicos desencadeiam estados citotóxicos que agem para diminuir o tamanho tumoral. Entretanto, a quimioterapia também pode induzir efeitos colaterais indesejáveis. Um dos efeitos que mais causam queixas nas pacientes com câncer de mama diz respeito a ocorrência de dificuldades cognitivas, que interferem diretamente nas atividades diárias, laborais e sociais, comprometendo o bem-estar destas mulheres. Isto ocorre, porque quimioterápicos causam neurotoxicidade central e periférica. Estão incluídos nas dificuldades cognitivas, problemas de memória, de atenção e de funções executivas, que em conjunto, são conhecidos como “chemobrain” (JEAN-PIERRE; MCDONALD, 2016; MOREAN; O'DWER; CHERNEY, 2015; JENILSENS, 2014; GANZ, 2013; KESLER et al., 2013; REUTER-LORENZ; CIMPRICH, 2013; CHEUNG et al., 2012).

Alterações cognitivas moderadas são relatadas em 15% a 50% das sobreviventes da doença até 10 anos pós quimioterapia, e relatos sugerem que muitos mais (até 75%) podem apresentar alterações cognitivas mais sutis durante o tratamento (CHRISTIE et al., 2012).

É importante salientar que, os distúrbios cognitivos mais frequentemente observados em pacientes com câncer de mama tratados com quimioterapia envolvem a função executiva e o comprometimento da memória (LANGE E JOLY, 2017). Entretanto, até o presente momento, os mecanismos que mediam o comprometimento cognitivo após a quimioterapia são desconhecidos. Algumas evidências sugerem que exista uma maior vulnerabilidade da substância branca a exposição a agentes quimioterápicos que contribuiria para a ocorrência de declínio das funções cognitivas após a quimioterapia (KOPPELMANS et al., 2014).

Porém, o número de pacientes e a intensidade deste sintoma colateral não é universal, indicando efeito farmacogenético ou de interação com outras variáveis. É possível que diversos fatores que levam as pacientes com câncer de mama, em tratamento quimioterápico, a apresentar quadros de sofrimentos psicológico (ansiedade e depressão) contribuam para um declínio cognitivo acentuado. Deste modo, a identificação de marcadores biológicos, que pudessem prever precocemente quais mulheres apresentam maior risco de declínio cognitivo associado a quimioterapia é uma questão de grande relevância clínica e social.

Investigações em modelos experimentais e seres humanos sugerem que quimioterápicos, em especial antraciclina como a doxorrubicina, induzem aumento no estresse oxidativo, dano de DNA e inflamação e estas condições atingem também o SNC contribuindo para o estabelecimento de declínio cognitivo (KEENEY et al., 2018; BAGNALL-MOREAU et al., 2019). Ainda, alguns agentes quimioterápicos alquilantes, como o metatrotexato, o 5-fluoracil e a ciclofosfamida parecem ter efeitos neurotóxicos diretos do que outros quimioterápicos, já que possuem a capacidade de penetrar a barreira sangue-cérebro, causando danos ao cérebro e sua funcionalidade e conectividade (DIETRICH, 2010).

Com base neste referencial, é possível que existam e seja possível detectar marcadores biológicos prévios de suscetibilidade ao desenvolvimento de declínio cognitivo que auxiliem a identificar estes pacientes, a fim de se adotarem estratégias que minimizem ou mesmo revertam precocemente este efeito colateral. Um modo de reconhecer déficit executivo associado a resposta quimioterapêutica é através da aplicação do Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (WCST). Este instrumento desenvolvido em 1948 avalia a capacidade do indivíduo raciocinar abstratamente e modificar suas estratégias cognitivas como resposta a alterações nas contingências ambientais (TRENTINI et al., 2018). O WCST é considerado padrão ouro na avaliação das funções executivas com danos em lobo frontal, sendo também utilizado para detectar déficits em pacientes com diversos tipos de câncer (RODGERS et al., 2003; MU et al., 2012; LI et al., 2014; CHIOU et al., 2019).

Assim, o presente estudo analisou, em mulheres com câncer de mama, a possível associação entre déficit executivo identificado via teste WCST e marcadores oxidativos sanguíneos iniciais (4h), que indicam resposta citotóxica imediata ao quimioterápico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos do câncer de mama

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), foi estimado que no ano de 2018, 627.000 mulheres morreram de câncer de mama no mundo. Estes números representam aproximadamente 15% de todas as mortes por câncer entre as mulheres (WHO, 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para 2018 foi estimada a ocorrência de 59.700 novos casos de câncer de mama no Brasil. Em termos epidemiológicos, excluindo o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais prevalente entre mulheres das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do País (INCA, 2018).

Existem inúmeros fatores de risco de câncer de mama incluindo o sexo, a idade, os níveis de estrogênio, a história familiar e as mutações gênicas herdáveis. Fatores reprodutivos incluindo menarca precoce, menopausa tardia, idade da primeira gestação e baixa paridade também podem aumentar o risco de câncer de mama. O acúmulo de risco combina-se com a tendência dos mecanismos de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) serem menos eficazes quando a pessoa envelhece. Por isto, a prevalência do câncer de mama tende a ser mais alta nas mulheres pós-menopáusicas e idosas (SUN et al., 2017).

O estilo de vida também influencia diretamente o risco de desenvolvimento da doença. Estes incluem uma alimentação inadequada, o sedentarismo, uso do tabaco e o alto consumo de álcool como os principais fatores de risco de câncer em todo o mundo. Evidências indicam que cerca de 30% das mortes por câncer devem-se à riscos comportamentais e dietéticos (WHO, 2018).

Fatores de risco são utilizados na prevenção e detecção precoce do câncer de mama. Entretanto, estudos epidemiológicos sugerem que apenas 50% do carcinoma mamário pode ser atribuído a um destes fatores de riscos fisiológicos, comportamentais (associado ao estilo de vida) ou genéticos. Entre os outros 50% de fatores de risco que ainda não foram totalmente confirmados, podem estar associados a aspectos psicológicos, especialmente a exposição ao estresse, que eleva os níveis séricos de cortisol, altera a homeostase do organismo, especialmente do sistema imune, propiciando um ambiente biológico para a progressão da doença, via falha na reparação celular (FERLAY et al., 2012).

2.2 Aspectos biológicos do câncer de mama

Em geral, as causas do câncer são multifatoriais e inter-relacionadas, podendo ser externas ao organismo ligadas ao meio ambiente, incluindo estilo de vida, fatores ambientais (como poluição), socioeconômicos e culturais. Entretanto, aproximadamente 10% dos cânceres estão associados a fatores hereditários (INCA, 2018; NARDIN, 2013, WHO 2018).

Uma característica marcante da doença é a alta capacidade proliferativa das células que parecem invadir rapidamente partes adjacentes do corpo, podendo gerar metástases, ou seja, a extensão para outros órgãos. As metástases são as principais causas de morte por câncer. As células cancerígenas desestabilizam a ordem e o funcionamento biológico do organismo, a partir de mudanças induzidas ativamente em seus genes. Uma vez considerada a possibilidade de agentes externos serem os principais causadores desse processo de indução de transformação celular, chegou-se à compreensão dos processos de mutagênese relacionados a carcinogênese (NARDIN, 2013; KEEN, DAVIDSON, 2003).

2.3 Fases da carcinogênese

A maior parte dos carcinomas se origina do tecido epitelial, uma vez que este é formado por células com alta taxa mitótica. Geralmente tumores mamários se originam a partir da hiperproliferação ductal que pode originar tumores benignos ou até mesmo carcinomas metastáticos. A origem destes tumores é consequência direta da estimulação constante do tecido mamário de diversos fatores carcinogênicos. Evidências têm sugerido que a carcinogênese é influenciada pelo microambiente tumoral, incluindo um papel importante do tecido conjuntivo (estroma) que sempre está associado ao tecido epitelial e também dos macrófagos. Estes elementos citocelulares parecem desempenhar um papel vital na iniciação e progressão do câncer de mama (SUN et al., 2017).

Por exemplo, estudos experimentais têm descrito que a glândula mamária de ratos pode ser induzida ao desenvolvimento neoplásico, quando apenas o estroma é exposto a carcinógenos, sem que haja exposição do epitélio. Em relação ao sistema imune, estudos também descreveram que os macrófagos podem gerar um microambiente inflamatório mutagênico, que pode promover a angiogênese e que também permitem que as células cancerígenas escapem da vigilância imunológica (QIAN; POLLARD, 2010; DUMAS; DIORIO, 2010). Em 1977, Hamburger e Salmon (1977) sugeriram pela primeira vez que um subconjunto de células cancerígenas denominadas células-tronco cancerígenas (CTCs), podem conduzir à tumorigênese. As CTCs representam uma subpopulação limitada de células que podem iniciar um determinado tumor. Quando as CTCs permanecem em um dado tecido, elas têm condições de refazer o tumor através da sua capacidade de recriar a heterogeneidade do

tumor original através de processos de divisão celular assimétrica (TOLEDO-GUZMÁN et al., 2018).

O diagnóstico precoce do câncer de mama é uma das melhores abordagens para controlar esta doença. Em alguns países desenvolvidos, a taxa de sobrevivência relativa de cinco anos de pacientes com câncer de mama, está acima de 80% devido à prevenção precoce. Na última década, grandes progressos foram realizados na compreensão do câncer de mama, bem como no desenvolvimento de métodos preventivos. A patogênese e mecanismos resistentes a drogas tumorais são revelados pela descoberta de células-tronco de câncer de mama e muitos genes são encontrados relacionados a patogênese desta doença. Atualmente, as pessoas têm mais opções de fármacos para o câncer de mama, enquanto a prevenção biológica foi recentemente desenvolvida para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

2.4 Genes associados ao câncer de mama e seu papel diagnóstico

É importante comentar que as alterações no DNA (mutações) que impulsionam o desenvolvimento do câncer são de diversos tipos, como rearranjos cromossômicos, mutações pontuais, alterações epigenéticas que levam a hipermetilação da região promotora ocasionando a inibição da expressão de genes de supressão tumoral ou que levam a hipometilação desta região, o que pode induzir a expressão dos chamados oncogenes. Um exemplo de hipermetilação estaria relacionado a inibição na expressão da proteína p53, que é considerada um gene de supressão tumoral. Também pode ocorrer mutação genética pontual no gene da proteína p53 que inibem a sua expressão (MISHRA; BRAT; VERMA, 2015).

Um exemplo epigenético relacionado a hipometilação do câncer é o do gene da survivina. Esta é uma proteína funcional que age inibindo a apoptose e regulação a progressão do ciclo celular. Geralmente a survivina é produzida em tecidos embrionários durante o desenvolvimento e indetectável na maioria dos tecidos adultos. A superexpressão de survivina ocorre frequentemente em vários cânceres humanos incluindo o câncer de mama. A expressão desta molécula tem sido relacionada a diagnóstico desfavorável na sobrevivência de pacientes (LI et al., 2017).

O advento das tecnologias baseadas em *array* permitiu a quantificação das alterações no número de cópias de DNA e a identificação de um perfil de expressão global de dezenas de milhares de genes em um único experimento. Avanços recentes, por exemplo, têm permitido a observação de mutações, rearranjos cromossômicos e alterações no número de cópias de células cancerosas em todo o genoma (PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018). Essas tecnologias têm auxiliado na classificação diagnóstica do câncer de mama além de fornecer um novo nível

de visão sobre complexidade das alterações genéticas e da existência da heterogeneidade intratumoral deste tipo de câncer (PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018).

Muitos genes foram identificados em relação ao câncer de mama que desempenham papéis-chave nos processos de iniciação e progressão do tumor. Alguns destes genes são a seguir comentados:

Genes 1 e 2 associados ao câncer de mama (*BRCA1 e BRCA2*): considerados anti-oncogenes para o risco de câncer de mama, uma vez que ambos codificam proteínas supressoras de tumor. A deficiência de *breast cancer 1, early onset* (BRCA1) relacionada a mutação neste gene leva à desregulação do ponto de checagem do ciclo celular, à duplicação anormal do centrôssomo, à instabilidade genética e, eventualmente, a inibição de apoptose. As mulheres que herdam uma mutação BRCA1 ou *breast cancer 2* (BRCA2) deletéria apresentam 70% mais risco de desenvolver câncer de mama das que sem a mutação. Nas mulheres portadoras de mutações nestes genes, embora a triagem anual com ressonância magnética (RM) e mamografia promova a detecção precoce da doença, o padrão-ouro para a prevenção primária do câncer de mama, neste caso, continua sendo a mastectomia bilateral (KOTSOPOULOS, 2018).

Gene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2): também é conhecido como gene c-erbB-2. A expressão deste gene é ativada principalmente através da amplificação e rearranjo gênico. Está associada a formação do ducto mamário e sua superexpressão é detectada em cerca de 15 a 20% dos cânceres de mama primários. Até o desenvolvimento de imunoterapia específica, as mulheres portadoras de mutação HER2 tinham mal prognóstico de sobrevivência. Ao longo dos últimos anos, avanços significativos foram feitos no tratamento de pacientes HER2+ (BARTSCH; BERGEN, 2018; SUN et al., 2017).

Gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR): nos seres humanos é também conhecido como c-erbB-1 ou Her1. A proteína EGFR é uma glicoproteína da família da tirosina quinase da superfície celular e é ativada por ligação a EGF, TGF- α , anfiregulina, betacelulina e assim por diante. A superexpressão de EGFR é encontrada em mais de 30% dos casos de câncer de mama inflamatório (IBC), um subtipo muito agressivo de câncer de mama. Pacientes com IBC positivo para *EGFR* têm pior prognóstico do que aqueles com *EGFR* tumores negativos. Mais da metade dos casos de câncer de mama triplo-negativo (TNBC), caracterizados pela ausência de receptor de estrogênio (ER), expressão de receptor de progesterona (PR) e amplificação de HER2, também apresentam superexpressão de EGFR. Portanto, futuras terapias com alvo no EGFR podem ser promissoras no tratamento destes tumores malignos (SUN et al., 2017; ROSKOSKI, 2019).

Gene c-Myc: codifica uma proteína, que é considerada um fator de transcrição que regula cerca de 15% dos genes humanos. Alguns dos genes regulados pelo Myc desempenham papéis cruciais na iniciação do câncer de mama. Assim evidências mostraram que a superexpressão do gene c-Myc é predominante em carcinoma de mama invasivo de alto grau enquanto que tecidos mamários saudáveis não apresentam amplificação deste gene (FALLAH et al., 2017; SUN et al., 2017).

Outros genes: existem outros genes que têm sido associados com risco de desenvolvimento de câncer de mama incluindo três genes que são membros da família Ras (H-ras, K-ras e N-ras). A associação ocorre quando mutações fazem com que um destes genes seja superexpresso no tecido mamário. Entretanto, a frequência destas mutações relacionadas ao câncer de mama é menor que 5%. Outros genes, incluindo mutações no gene da proteína p53 encontrados em aproximadamente 30% dos cânceres de mama também têm sido descritos (SUN et al., 2017).

Uma vez que ocorre uma diversidade de genes envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama, esta doença não pode ser considerada como uma entidade patológica única, mas sim representa um grupo heterogêneo de doenças com comportamento clínico altamente variável (ALI et al., 2014). De fato, patologistas têm reconhecido há muito tempo tal diversidade em nível morfológico, que acaba se refletindo nos vários tipos histológicos especiais de câncer de mama com suas aparências microscópicas distintas e resultados clínicos associados (BLAMEY et al., 2010; SUN et al., 2017).

Atualmente, a idade da paciente ao diagnóstico, o tamanho do tumor, o número de linfonodos comprometidos, o grau de diferenciação tumoral (estadiamento anátomo-patológico TNM- tamanho, linfonodos, metástase), o subtipo molecular (Luminal A, Luminal B, HER2, Triplo negativo) e o estadiamento clínico são os principais parâmetros usados no diagnóstico, tratamento e prognóstico de sobrevivência do paciente (BLAMEY et al., 2010).

Em geral, os seguintes subtipos de carcinoma de mama são diagnosticados: (1) Carcinoma ductal *in situ* (CDIS); (2) Carcinoma lobular *in situ* (CLIS); (3) Carcinoma ductal invasivo (CDI) que representa cerca de 80% dos cânceres da mama invasores (ou invasivos); (4) Carcinoma lobular invasivo (CLI) e (5) Carcinoma inflamatório da mama, que é um câncer agressivo, apesar de ser mais raro (PROVENZANO; ULANER; CHIN, 2018).

Atualmente o diagnóstico também é baseado em um painel de expressão de genes que pode ser utilizado para definir a terapêutica do tratamento. Assim, existem quatro subtipos moleculares intrínsecos de carcinoma de mama que se correlacionam com o prognóstico: luminal A, luminal B, HER2 positivo e o triplo negativo. A avaliação genômica é considerada

o padrão ouro para a classificação dos subtipos tumorais. Entretanto, a mesma é complexa e possui um alto custo o que não torna viável o seu uso cotidiano na clínica médica. Por outro lado, foi observada uma concordância alta entre resultados genômicos e aqueles fornecidos pela imunohistoquímica. Assim, a imunohistoquímica continua sendo utilizada para a identificação destes subtipos de cânceres de mama. Contudo, por ser uma análise indireta o termo “like” (provável) é acrescentado na avaliação. (SERRA et al., 2014).

Uma recente publicação do ensaio clínico TAILORx, no "*New England Journal of Medicine*", sugere que o ensaio de 21 genes pode beneficiar até 85% das mulheres com câncer de mama inicial, que podem ser poupadas da quimioterapia adjuvante. As limitações desses achados ainda são o alto custo do exame, inacessível para a maioria da população brasileira que depende do SUS (71%), bem como o critério de elegibilidade para a plataforma gênica, indicada somente para cânceres em estágio inicial e HER2 negativo (SPARANO et al., 2018).

Baseado na “*St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel*”, que é um evento científico relevante na área do câncer de mama, foi desenvolvida a classificação dos subtipos de câncer da mama realizada através da imunohistoquímica e da hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Esta conferência sustentou que o uso do receptor de estrógeno (RE), do receptor de progesterona (RP), do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) e do Ki-67 permitiria a classificação dos subtipos de câncer de mama existentes. Assim, estes marcadores moleculares têm sido utilizados para a realização do diagnóstico dos subtipos moleculares auxiliando na determinação do tipo de tratamento, incluindo esquema quimioterápico, hormonioterapia e imunoterapia (SERRA et al., 2014).

Em síntese, pode-se dizer que o entendimento desses processos biomoleculares do câncer de mama, a evolução tecnológica de diagnóstico precoce, a produção de fármacos cada vez mais eficientes e as novas abordagens terapêuticas resultaram na alteração do *status* do câncer de enfermidade fatal para prevenível, crônica e, em alguns casos, curável (WHO, 2018).

2.5 A quimioterapia no câncer de mama

Os tratamentos para o câncer de mama podem envolver cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. A combinação ou não desses procedimentos vai depender da especificidade de cada caso. Entre esses, a indicação de quimioterapia acontece na maioria deles, dado seu efeito sistêmico no combate às células tumorais. Os agentes quimioterápicos afetam tanto células neoplásicas como as saudáveis, acarretando maior dano às células malignas do que aos demais tecidos, devido as diferenças qualitativas e quantitativas

entre os processos metabólicos dessas células. No entanto, os quimioterápicos também podem desencadear estados citotóxicos no organismo, responsáveis pelos efeitos colaterais da quimioterapia (INCA, 2018).

Uma vez que o câncer de mama seja diagnosticado, o esquema de tratamento geralmente envolve intervenção cirúrgica e indicação de quimioterapia. Quando indicada, a quimioterapia consiste no uso de mais de um fármaco, que é iniciada de quatro a 12 semanas após o procedimento cirúrgico. O tratamento consiste em ciclos de 21 dias, isto é, os fármacos são administrados a paciente a cada três semanas, podendo variar os intervalos, dependendo do esquema adotado. Entre os ciclos, existe um período de descanso, para permitir que o organismo se recupere da intensa ação destes fármacos. O tempo total do tratamento varia de acordo com o tipo de esquema quimioterápico prescrito, mas geralmente ocorre entre três a seis meses (INCA, 2018).

O impacto do quimioterápico no organismo é extremamente forte já que pode afetar diretamente a taxa de proliferação celular e apoptose via modulação do ciclo celular. Em termos farmacológicos, os quimioterápicos podem ser agrupados de acordo com a sua estrutura química e também a partir da sua interação com outros medicamentos. Muitas vezes os esquemas terapêuticos incluem mais de um tipo de quimioterápico. Em geral, grandes classes de quimioterápicos são utilizadas no tratamento do câncer de mama. Algumas classes como os agentes alquilantes, os antimetabólitos e os antibióticos antitumorais agem diretamente na fase S (síntese) do ciclo celular (Figura 1). No caso, os agentes alquilantes levam a fragmentação da molécula de DNA, os antimetabólicos interferem na replicação do DNA impedindo a produção de moléculas corretas e funcionais que permitiriam a geração de novas células cancerosas, e os antibióticos antitumorais interferem na função das enzimas, necessárias para a replicação do DNA das células.

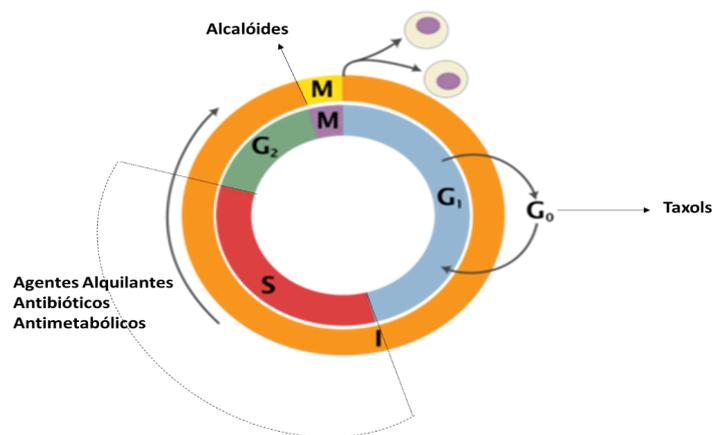


Figura 1. Ação nas diversas fases do ciclo celular, dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama. M= fase da mitose; I= interfase; G₀, G₁ e G₂ = fases (gap = intervalos); S= fase de síntese (replicação) do DNA. Fonte: a autora

Existem também quimioterápicos identificados como inibidores mitóticos que são compostos derivados de produtos naturais (plantas) como é o caso dos taxanos. Estes quimiofármacos danificam a maquinaria proliferativa impedindo a produção de proteínas relacionadas com a mitose. Portanto, eles agem entre a mitose e a fase G₀ do ciclo celular. Outra categoria de quimiofármaco são os chamados “alcalóides de vinca” que são moléculas que impedem a produção de microtúbulos, e assim a mitose celular. Também existem outros quimioterápicos incluindo inibidores da topoisomerase (que é fundamental para a síntese de novas moléculas de DNA). Além destes fármacos o câncer de mama pode ser tratado por hormonioterapia e imunoterapia.

Apesar da sua eficácia, como já foi anteriormente comentado, a maior parte dos quimioterápicos causam efeitos colaterais que impactam diretamente na qualidade de vida das pacientes e também podem acabar afetando a eficácia do tratamento. Entre estes estão: fadiga; dor; alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos, mucosite oral, diarreia ou constipação); alterações neurológicas (distúrbio cognitivo, hipersonia, insônia); alterações na pele (alopecia); alterações psiquiátricas (ansiedade); entre outros. Os efeitos terapêuticos e tóxicos desses agentes dependem do tempo de exposição e da concentração plasmática desses fármacos (INCA, 2018).

As mudanças causadas pelo tratamento quimioterápico são vivenciadas pelas mulheres como algo de difícil manejo. Além do ônus de ser diagnosticada com uma doença grave, as pacientes devem enfrentar potenciais efeitos colaterais ao tratamento. Um bom exemplo clínico dessas queixas são as neurotoxicidades, associados a diversos efeitos no cérebro, incluindo o déficit cognitivo (MENNING, et al., 2015).

2.6 A Quimioterapia no câncer de mama e o déficit cognitivo

Uma revisão recente sobre o tema, feita por Yang e Hendrix (2018), aponta que, nos Estados Unidos, aproximadamente 3,1 milhões de mulheres estão vivendo com câncer de mama e até 75% dessas mulheres sofrem, em algum grau, de comprometimento cognitivo relacionado ao câncer (CIRC) (GIESE-DAVIS et al., 2015; CHIRIAC; BABAN; DUMITRASCU, 2018).

O comprometimento cognitivo relacionada ao câncer, pode ser caracterizada pelo comprometimento e déficits em áreas que envolvem funções da memória, atenção, velocidade

de processamento e funções executivas (JENELSINS, 2014). De fato, mudanças cognitivas são frequentemente relatadas por mulheres em tratamento quimioterápico. Estas alterações têm sido foco de pesquisa chamadas de “Chemobrain” (JEAN-PIERRE; MCDONALD, 2016; MOREAN; O'DWER; CHERNEY, 2015). Os sintomas podem persistir por meses e até anos após o fim do tratamento (JANELSINS et al, 2018), embora os mecanismos neuropsicológicos subjacentes ainda não sejam bem compreendidos (HENNEGHAN, 2015; BOWER; GANZ, 2015; JOLY et. al., 2012; KANASKIE; LOEB, 2015; ZHENG et al., 2014; COLLINS et. al., 2014; JUNG; CIMPRICH, 2014; ANDO-TANABE et. al., 2012; KESLER et. al., 2013; GANZ et. al., 2013; REUTER-LORENZ; CIMPRICH, 2013; CHEUNG et. al., 2012).

Das funções cognitivas afetadas pelo tratamento quimioterápico, destaca-se o papel fundamental das funções executivas (FE), devido ao impacto que exerce na vida cotidiana dessas mulheres. As funções executivas podem ser consideradas como um conjunto complexo de habilidades cognitivas simultâneas, com o objetivo de coordenar e orientar o desempenho e planejamento de objetivos futuros, resultante da inter-relação entre cérebro, comportamento e emoções (DIAMOND, 2013; SILVA-FILHO HUMBERTO, PASIAN, 2011; TRENTINI et al., 2006).

A compreensão da cognição humana passou por transformações conceituais nas duas últimas décadas. O motivo da mudança de paradigma, se dá pelo fato da comunidade científica considerar que a estrutura dos circuitos cerebrais vai além da anatomia estrutural, envolvendo relações funcionais e de conectividades do cérebro complexas. Essas conexões funcionais variam em relação ao contexto e são alteradas por variáveis cognitivas, motivacionais e emocionais (PESSOA, 2008). Neste contexto, Pessoa (2008), propôs um novo conceito que envolve “sistemas funcionalmente integrados corticais-subcorticais” responsáveis pelo funcionamento do cérebro emocional. Este modelo é baseado na organização de redes de larga escala, que evoluem temporalmente, e suas interações com a percepção, cognição, motivação e ação. Neste modelo, tanto o córtex, quanto o subcórtex fazem parte do extenso sistema conectivo que liga corpo e cérebro, os quais se afetam mutuamente. Por ser um sistema altamente complexo e dinâmico, o mesmo é diretamente afetado pelo entorno socioambiental.

Está bem estabelecido que as regiões pré-frontais exercem um papel fundamental na organização das funções executivas e, por consequência, nas tomadas de decisão (PALMINI; HAASE, 2007). No contexto da doença, alterações nas funções executivas podem interferir na adesão e no prognóstico do tratamento, bem como na retomada da rotina de trabalho (JEAN-PIERRE; MCDONALD, 2016). Estes estudos têm avaliado a potencial de associação entre métodos de testagem neuropsicológica e neuroimagem para compreender os efeitos

psicológicos, funcionais, metabólicos e de conectividade antes, durante e após a exposição à quimioterapia (STOUTEN-KEMPERMAN et. al., 2015; SCHAGEN, et al., 2014).

A ressonância magnética funcional (fMRI) tem sido a técnica de neuroimagem, muito utilizada nestes estudos, por ser não invasiva e ter o potencial de revelar os circuitos neurais subjacentes a problemas cognitivos após o tratamento quimioterápico em pacientes com câncer de mama (RUITER; SCHAGEN, 2013). Esta análise mede a ativação cerebral associada a diferentes estados mentais e avança significativamente nossa compreensão da função e disfunção cognitiva em populações saudáveis e clínicas (REUTER-LORENZ; CIMPRICH, 2013; SAYKIN, et al. 2013).

McDonald, et al. (2010) publicaram o primeiro estudo de neuroimagem longitudinal de pacientes com câncer de mama, relatando a ocorrência de diminuição da densidade da substância cinzenta um mês após o término da quimioterapia, especialmente em regiões frontais. Esses achados ajudaram a confirmar a existência de uma base neural relacionada aos sintomas de déficit cognitivos que envolvem mais comumente processos executivos e de memória, nos quais os lobos frontais são um componente crítico dos circuitos neurais subjacentes (MCDONALD, et al., 2013).

Estudos de neuroimagem fornecem uma visão sobre os efeitos da quimioterapia no cérebro, demonstrando lesão cerebral sutil, mas difusa. Na revisão sobre o tema, Kesler et al (2014), destacam que os possíveis mecanismos de lesão cerebral pós quimioterapia para câncer de mama incluem: (1) toxicidade direta para células progenitoras neurais; (2) estresse oxidativo, elevação e liberação de citocinas; (3) ocorrência de danos no DNA e alterações epigenéticas; (4) suprimento sanguíneo cerebral alterado em consequência de lesões em vasos sanguíneos e/ou anemia induzida por quimioterapia. Portanto, este estudo destacou que a pesquisa do câncer de mama tem amplas implicações para a neurociência em termos dos efeitos de vários fatores fisiológicos nas relações cérebro-comportamento (ASHER et al., 2011; LANGE E JOLY, 2017).

Uma outra investigação observacional realizada por Kesler (2011) identificou que mulheres com câncer de mama apresentavam ativação significativamente reduzida do córtex pré-frontal dorsolateral médio esquerdo e do córtex pré-motor em comparação a controles saudáveis. O estudo também mostrou que a região pré-frontal lateral caudal esquerda poderia ser particularmente vulnerável aos efeitos da quimioterapia e/ou gravidade da doença. Por este motivo, os autores sugeriram que esta modificação poderia ser considerada um novo biomarcador de disfunção executiva subjetiva em mulheres tratadas com quimioterápicos. Além disso, os efeitos negativos da quimioterapia na função cerebral poderiam ser exacerbados

por fatores como aumento da idade e menor nível educacional, influenciando o desempenho das funções executivas (KESLER, 2011).

Outras investigações posteriores utilizando análises de imagem, como a conduzida por Bruno et al (2012), também fizeram um primeiro relato de alterações em redes cerebrais funcionais em grande escala em repouso, em pacientes com câncer de mama, que estavam sendo tratadas com quimioterapia. Os resultados obtidos, quando comparados com controles saudáveis, contribuíram com novas informações sobre os mecanismos neurobiológicos subjacentes ao comprometimento cognitivo relacionado ao câncer de mama e a quimioterapia.

Estudos longitudinais confirmaram o impacto do tratamento quimioterápico na função neural, como é o caso do trabalho publicado por Ruitter e Schangen (2013). Estes pesquisadores acompanharam por nove anos os efeitos da quimioterapia adjuvante na substância branca e cinzenta do cérebro em sobreviventes de câncer de mama primário. Este acompanhamento foi feito via ressonância magnética (MRI) multimodal, e incluiu a comparação dos resultados com um grupo de sobreviventes de câncer de mama que não receberam quimioterapia. Os resultados convergiram, sugerindo que altas doses de quimioterapia adjuvante para câncer de mama estavam associadas a produção de lesões de longo prazo na substância branca. Estas lesões, presumivelmente refletiram uma combinação de degeneração axonal e desmielinização, e danos à substância cinzenta com déficits funcionais associados. Testes neuropsicológicos complementares também sugeriram maior comprometimento cognitivo no grupo quimioterapia.

Outra investigação prospectiva utilizando fMRI avaliou pacientes pré-quimioterapia e pós-quimioterapia e descreveu ocorrência de depressão, ansiedade e fadiga após alguns dias em que a quimioterapia foi iniciada. O estudo mostrou que, após a quimioterapia, as pacientes apresentaram menor ativação na ínsula bilateral, no córtex orbitofrontal inferior esquerdo e no giro temporal médio esquerdo (ZUNINI, et al., 2013).

Um importante estudo realizado por Lepage, et al. (2014), confirmou as hipóteses de que as alterações da substância cinzenta seriam mais pronunciadas e distribuídas logo após a quimioterapia, bem como a diminuição da substância cinzenta estaria relacionada a piora no funcionamento cognitivo em pacientes com câncer de mama (LEPAGE, et al., 2014).

Estudos sugerem que os déficits cognitivos causados pela quimioterapia têm impacto na perda da reserva cognitiva e podem induzir ao envelhecimento prematuro do cérebro (SALAS-RAMIREZ, et al., 2015).

No estudo observacional denominado *“Neurotoxic Effects of Anthracycline vs Nonanthracycline-Based Chemotherapy on Cognition in Breast Cancer Survivors”* publicado

na revista JAMA Kesler e Blayney, (2016) relataram associação dos regimes a base de antraciclinas com alterações cognitivas e cerebrais em mulheres com câncer de mama. Os resultados deste estudo demonstrou que as antraciclinas poderiam ter efeitos negativos em domínios cognitivos específicos e conexões de redes cerebrais do que os regimes quimioterápicos que não utilizavam antraciclinas.

Assim, acredita-se que a função executiva é, comumente, um dos domínios cognitivos mais afetados em mulheres tratadas com quimioterapia para câncer de mama (KESLER, et al., 2013; TAO, et al., 2017; WANG, et al., 2016). Estudos complementares também têm mostrado que as funções executivas podem ser afetadas pelo tipo de molécula utilizada no tratamento. Por exemplo, alguns agentes quimioterápicos alquilantes, como o metatrotexato, o 5-fluoracil e a ciclofosfamida parecem ter efeitos neurotóxicos diretos quando comparados com outros quimioterápicos, já que possuem a capacidade de atravessar a barreira sangue-cérebro, (DIETRICH, 2010).

Outra ferramenta para avaliação das funções executivas, de reconhecimento internacional como padrão ouro, é o Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (WCST), criado em 1948 para avaliação neuropsicológica de funções executivas que envolvem os lobos frontais. (TRENTINI et al., 2006). Este método, quando associado à outras medidas, pode ser um dado relevante na coleta de informação (*screening*) sobre o status cognitivo da paciente em diferentes momentos do tratamento.

2.7 Potenciais mecanismos causais na indução do declínio cognitivo pela quimioterapia

A Figura 2 apresenta um esquema geral dos potenciais mecanismos de ação envolvidos na indução de declínio cognitivo, em especial déficit executivo induzido pela quimioterapia.

Na situação terapêutica desejada, a elevação de estados oxidativos e inflamatórios pelo tratamento quimioterápico são eventos esperados. Isto porque o quimioterápico irá induzir morte das células tumorais (principalmente via apoptose), que por sua vez gerará debris celulares que serão fagocitados, inicialmente pelos macrófagos residentes no tecido onde se encontra o tumor. A ativação dos macrófagos ocorre quando os níveis de restos celulares se elevam fazendo com que estas células aumentem os níveis de óxido nítrico e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) que são utilizadas para fagocitar estes restos celulares. Os macrófagos também vão atuar via liberação de citocinas inflamatórias para o meio extracelular, que sinaliza e recruta para o local, uma maior quantidade de células imunes, que também ajudam na limpeza das células mortas. Parte das moléculas, originadas dos resíduos metabólicos, retorna ao sangue para serem depuradas. Na medida em que ocorre esta limpeza

tecidual, os níveis de citocinas pró-inflamatórias diminuem, enquanto os níveis de citocinas anti-inflamatórias aumentam, induzindo regeneração tecidual. Deste modo, espera-se que, entre um ciclo e outro de quimioterapia, este processo ocorra de modo controlado, já que são as células tumorais as células-alvo dos quimioterápicos.

Entretanto, muitas mulheres apresentam sensibilidade ao quimioterápico, o qual induz aumento do estresse oxidativo e efeito citotóxico relevante. No sangue, este efeito citotóxico pode levar a estados de neutropenia, levando, nestes casos, a interrupção do tratamento quimioterápico ou intervalos maiores entre os ciclos. Investigações, inclusive têm sido feitas, sugerindo que níveis elevados de interleucina 6 (IL-6) e proteína C-reativa poderiam ser preditoras de febre neutropênica em pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia (NETTERBERG et al., 2018).

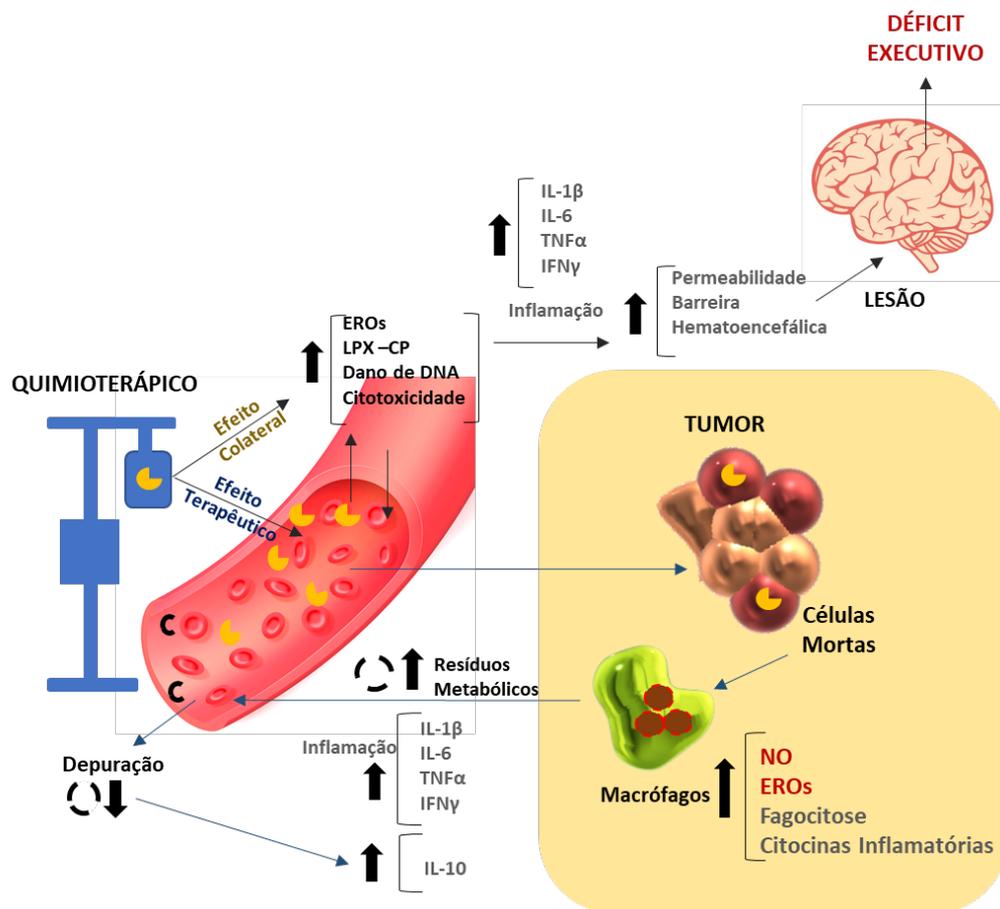


Figura 2: Esquema geral do efeito dos quimioterápicos no metabolismo oxidativo e inflamatório. Considerando o efeito terapêutico desejado, o quimioterápico entra no organismo, via corrente sanguínea, e é transportado até o tecido onde está o tumor. Ali, o fármaco atua nas células-alvo tumorais induzindo diminuição na taxa de proliferação celular e morte celular (via apoptose, piroptose ou necrose conforme o quimiofármaco). O aumento

de células mortas pode levar ao acúmulo de debris, que são fagocitados pelos macrófagos residentes, e que também induzem estados inflamatórios transitórios. Na medida que o próprio quimioterápico é depurado e os restos metabólicos, ocasionados pela morte das células tumorais, são também depurados, espera-se que a resposta inflamatória seja finalizada. Entretanto, o quimioterápico pode induzir estresse oxidativo e citotoxicidade, os quais aumentam o estado inflamatório, alterando a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Esta condição pode levar a estados neurotóxicos, induzindo a lesão cerebral e consequentemente declínio cognitivo (incluindo aqui a disfunção executiva). EROS – espécies reativas de oxigênio; LP – lipoperoxidação; CP- carbonilação de proteínas.

Em relação ao efeito neurotóxico, investigações em modelos experimentais têm sugerido que alterações no SNC, induzidas por quimioterápicos como antraciclinas (em especial a doxorubicina, estariam ligados a ocorrência de estresse oxidativo no cérebro, em especial no hipocampo (KEENEY et al., 2018; BAGNALL-MOREAU et al., 2019). A este respeito Ren et al (2018) propuseram que a ocorrência de três alterações estariam associadas com alterações cerebrais de camundongos tratados com doxorubicina: dano oxidativo, disfunção mitocondrial e perda de biomoléculas contendo colina. O aumento de danos oxidativos em células saudáveis pode causar dano de DNA e indução dos níveis de apoptose. Ou, também pode levar a estados de lipoperoxidação de membranas e carbonilação de proteínas, que alteram a função celular e as tornam mais suscetíveis a eventos de morte celular por necrose. Por sua vez, o excesso de resíduos metabólicos conhecidos como DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) no plasma sanguíneo, causada por células saudáveis e tumorais mortas pelo quimioterápico, podem contribuir para a ativação da resposta inflamatória, principalmente por macrófagos.

Os macrófagos, possuem dois estados fenotípicos importantes que atuam na resposta inflamatória. No período de ativação, os macrófagos conhecidos como M1 liberam para o meio extracelular citocinas pró-inflamatórias, como é o caso da interleucina 1-beta (IL-1 β), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interferon gama (IFN γ). Além disto, produzem níveis elevados de óxido nítrico (ON) que estimulam a sua atividade fagocítica que é utilizada para retirar os resíduos do plasma. Em uma resposta inflamatória clássica, desencadeada por exposição a um patógeno ou por uma lesão tecidual logo após a limpeza dos resíduos, os macrófagos M1 mudam o seu fenótipo para M2, e passam a atuar como células anti-inflamatórias. Neste caso, produzem citocinas como a interleucina 10 (IL-10), que inibe a produção e liberação das citocinas maduras para o plasma e induzem a regeneração tecidual (LI et al.,2018).

Em geral, as citocinas pró-inflamatórias são sintetizadas a partir de genes nucleares e ficam sob uma forma inativa no citoplasma das células imunes, em especial macrófagos. Quando ocorre ativação destas células, por ação da caspase 1, as citocinas pró-inflamatórias se

tornam maduras e são liberadas para o citoplasma. Este processo induz maior produção de citocinas no citoplasma via aumento na expressão gênica das mesmas. Sendo assim, níveis elevados de expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias podem servir como marcadores de modulação inflamatória por algum tipo de fármaco, como é o caso da doxorrubicina (LIAO et al., 2018).

Jannelsins et al (2012) avaliaram os níveis de citocinas em pacientes com câncer de mama em dois momentos do ciclo de quimioterapia (ciclo 2 e ciclo 4). Os resultados mostraram, que o aumento nos níveis de citocinas inflamatórias como a IL-6, sugere, que a modulação destas citocinas, induzidas, principalmente, pelas antraciclinas, poderia ser um elemento chave no desencadeamento da disfunção cognitiva. Entretanto, como a indução de estados inflamatórios ocorre em uma etapa posterior aos eventos de estresse oxidativo e de citotoxicidade, é possível que a observação da intensidade da resposta oxidativa e citotóxica, já na primeira exposição ao quimioterápico, possa ser preditiva de declínio cognitivo, em especial déficit executivo avaliado pelo teste WCST.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a associação entre resposta oxidativa e citotóxica precoce induzida pela exposição a quimioterápicos, com déficit executivo, em mulheres com câncer de mama.

3.2 Objetivos específicos

A partir do acompanhamento longitudinal de mulheres com câncer de mama, submetidas a quimioterapia, analisar:

- (1) A prevalência de indicadores de déficit executivo precoce ao longo do 2º e 4º ciclos de quimioterapia.
- (2) Analisar a prevalência de depressão e ansiedade nas mulheres ao longo do 2º e 4º ciclos de quimioterapia
- (3) Analisar potencial influência da idade, indicadores socioculturais (escolaridade, etc), e psicológicos (ansiedade e depressão), no desenvolvimento de indicadores precoces de déficit executivo;
- (4) Avaliar a associação e o potencial efeito preditor de marcadores oxidativos (ON, EROS, LP, CP, dsDNA) e citotóxicos do quimioterápico no 1º ciclo da quimioterapia, como desenvolvimento de indicadores precoces de déficit executivo no 2º e 4º ciclos da quimioterapia;
- (5) Avaliar a influência da modulação da expressão gênica de citocinas relacionadas a resposta inflamatória com o desenvolvimento de indicadores precoces de déficit executivo;

4. HIPÓTESES

Existe alta prevalência de declínio cognitivo (em especial déficit executivo) em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia. Entretanto, marcadores de risco para a ocorrência deste efeito colateral indesejável ainda precisam ser identificados, para que o declínio cognitivo seja precocemente manejado. Estudos prévios sugerem que esta associação poderia estar relacionada com o aumento nos níveis de estresse oxidativo, citotoxicidade e inflamação, induzidos pelos quimiofármacos. Assim, é plausível que a resposta oxidativa e citotóxica imediata a exposição ao quimiofármaco seja um potencial marcador de desenvolvimento precoce de déficit executivo. Esta é a principal hipótese testada neste estudo.

5. MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Uma investigação observacional, transversal foi conduzido em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia.

A primeira etapa do estudo consistiu em responder a uma entrevista sociodemográfica, seguida da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e realizado coleta de sangue. A segunda etapa, consistiu no procedimento de avaliação neuropsicológica no 2º ciclo e no 4º ciclos de quimioterapia.

Na primeira etapa, duas coletas de sangue foram realizadas. Uma antes de começar o 1º ciclo de quimioterapia e outra, aproximadamente quatro horas depois da primeira dose do quimioterápico, a fim de analisar marcadores oxi-inflamatórios.

Com base em estudos prévios, como descrito na revisão de Yang e Hendrix (2018), que indicaram que a quimioterapia pode aumentar o risco de sofrimento psicossocial e disfunção neural, estes parâmetros foram avaliados no 2º e 4º ciclos da quimioterapia através da aplicação de instrumentos neuropsicológicos devidamente validados no país: Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) e Inventário de Depressão de Beck II (BDI-II), Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (WCST) e subtestes da Escala de Inteligência Wechsler para Adultos III (WAIS) (GORENSTEIN; ANDRADE, 1996; GOMES-OLIVEIRA et al., 2012).

Considerando que estes testes sempre se referem a situação emocional atual em relação a uma situação pregressa, as pacientes foram solicitadas a fazer uma comparação com o que habitualmente sentiam no 2º e 4º ciclos da quimioterapia. Foi respeitado o intervalo para o reteste, conforme informado nos manuais dos referidos testes. O intervalo entre o 2º e 4º ciclos de quimioterapia totalizou 42 dias.

Para avaliar as funções executivas, foram eleitos: o Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (WCST) (HEATON et al., 2004), considerado o padrão ouro para avaliar funções executivas, especialmente áreas de controle inibitório, memória de trabalho e flexibilidade cognitiva, que envolvam os lobos frontais (DIAMOND, 2013) e dois subtestes da Escala de Inteligência Wechsler para Adultos III (WAIS): Dígitos e Procurar Símbolos, para avaliar memória de trabalho e velocidade de processamento, respectivamente (WECHSLER, 2004).

5.2 População e amostra

O cálculo amostral foi conduzido da seguinte maneira: adotou-se a incidência do câncer de mama no Estado do Rio Grande do Sul previsto para o ano de 2018 em 5.110 casos, dados fornecidos pelo INCA. Consideramos a população do RS em 10.693.929 e em Santa Maria de 261.031, segundo dados do último censo populacional do IBGE para a década de 2010-2018. Na sequência, calculamos através de uma regra de 3 simples, o número de novos casos da doença proporcional ao número de habitantes. Esse cálculo resultou em 124,8 novos casos da doença para Santa Maria. O tratamento desses números segue, devido a amostra ser de pacientes usuárias da saúde suplementar, ou seja, pacientes particulares e de convênios de saúde. Aqui, seguimos com o seguinte raciocínio, se aproximadamente 71% da população do país é usuária do SUS e 29% utiliza saúde suplementar, é coerente que para termos um dado amostral que retratasse a realidade do contexto em que o estudo foi conduzido, convertêssemos o número de 125 novos casos de câncer de mama estimado para Santa Maria. Assim, novamente uma regra de 3 simples foi calculada e o resultado foi uma população de 36 mulheres. Por fim, utilizando um intervalo de confiança de 95% e um erro amostral de 8%, chegou-se a um tamanho amostral de 30 mulheres.

Dada incidência e prevalência do câncer de mama, a população estudada, foi composta por mulheres, diagnosticadas pela primeira vez com câncer de mama, encaminhadas pelo médico responsável para tratamento quimioterápico à Clínica de Hematologia e Oncologia Viver (pacientes conveniadas ou particulares), na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018. A amostra foi de conveniência, constituída por 40 mulheres que atenderam aos critérios de inclusão. As voluntárias iniciaram o protocolo de quimioterapia em até 20 dias após o procedimento cirúrgico ou, logo após o diagnóstico, quando indicado quimioterapia neoadjuvante.

5.3 Critérios de inclusão e exclusão

O estudo incluiu mulheres com diagnóstico primário de câncer de mama (com e sem metástase); indicação de tratamento quimioterápico; com idade ≥ 18 anos. Os critérios de exclusão foram: debilidade física e/ou psíquica para participar do estudo e com doenças crônico-degenerativas e psiquiátricas prévias, que poderiam interferir nos resultados obtidos, bem como as que se recusaram em participar da pesquisa.

5.4 Instrumentos de coleta de dados

5.4.1 Avaliação geral do voluntário

Uma entrevista sociodemográfica e clínica, semiestruturada, composta por duas partes (identificação e história clínica) foi aplicada com o objetivo de coletar dados gerais. Este instrumento foi elaborado a partir dos dados dos prontuários físicos e eletrônicos da paciente (Interprocess - Gemed), utilizado pela Clínica de Oncologia e Hematologia Viver.

5.5 Instrumentos de coleta e processamento do sangue

5.5.1 Análises laboratoriais dos marcadores bioquímico-moleculares

Para a execução desta etapa do estudo foram coletadas e utilizadas amostras de sangue obtidas das voluntárias do serviço de Oncologia da Clínica Viver em Santa Maria- RS e realizados testes *in vitro* de modo similar ao descrito em Barbisan et al. (2014) e Capeleto et al. (2015). A coleta de sangue foi realizada pela equipe de enfermagem, a mesma que aplica o tratamento quimioterápico nas pacientes. Para tanto, coletaram amostras de sangue via cateter implantado supraclavicular ou via punção venosa. Duas coletas de 10 ml de sangue foram realizadas: sangue virgem de tratamento (sangue controle, C) ou seja, antes do início da administração da quimioterapia, e sangue após o término do primeiro ciclo de quimioterapia (sangue com quimioterápico, Q).

Ambas coletas foram feitas em tubos vacutainer contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), como anticoagulante. As amostras de sangue foram mantidas em refrigeração em um prazo máximo de 2 horas e transportadas para o Laboratório de Biogenômica na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), onde primeiramente o plasma foi separado das hemácias e leucócitos por centrifugação (3000 rpm) por 15 minutos. Posteriormente, esse plasma foi utilizado para quantificação de alguns parâmetros oxidativos, inflamatórios.

5.5.2 Cultura celular *in vitro* e análise da atividade mitocondrial e viabilidade celular

O potencial efeito da quimioterapia, foi verificado utilizando-se células periféricas mononucleares do sangue (CPMS) obtidas através de centrifugação por gradiente de densidade, utilizando Histopaque® (Sigma-Aldrich – 10771). As mesmas foram equitativamente distribuídas em placas de 6-poços contendo meio de cultura (RPMI), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico e antifúngico. As placas foram mantidas em estufa a 37C° com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após este período, o efeito citotóxico nas CMSPs foi avaliado via análise da atividade mitocondrial que mede indiretamente a viabilidade celular através do ensaio do 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheny tetraoliumbromide (MTT). Os níveis de fragmento de DNA livre no meio de cultura

foram aqui utilizados como marcadores de mortalidade celular. Estes testes foram conduzidos similar aos descritos em Jung et al (2015).

O ensaio MTT conforme Jung et al (2015), avalia a viabilidade celular, através do reagente MTT na concentração de 5 mg/ml diluído em tampão fosfato pH 7,4, que tem a capacidade de entrar na mitocôndria, formando cristais de formazan intracelulares de coloração azul/violácea. Resumidamente, o sal de tetrazólio hidrossolúvel e de coloração amarelada, é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em cristais de formazan, insolúveis em água e de coloração roxo-azulada, que ficam armazenados no citoplasma celular, sendo posteriormente solubilizados pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, realizada a quantificação colorimétrica em um leitor *SpectraMax® M2/M2 (Molecular Devices Corporation)*. A absorvância foi medida a 570 nm (JUNG et al., 2015).

A fim de complementar a determinação de viabilidade celular, foi conduzido o ensaio fluorimétrico de determinação da presença de DNA dupla fita livre no meio celular, utilizando o corante Quant-iT™ PicoGreen® *Double-Stranded DNA (dsDNA)*, obtido da empresa Invitrogen (*Life Technologies*), o qual é um reagente fluorescente e estável que possui alta afinidade pelo DNA de fita dupla, permitindo assim, a avaliação da integridade celular, partindo do princípio de que a presença de DNA livre no meio é indicativo de morte celular por rompimento de membranas. A última metodologia empregada, foi baseada no descrito por Ahn e colaboradores (1996), utilizando 10µL de amostra juntamente com 80µL do tampão fosfato e 10 µL do reagente fluorescente PicoGreen, seguido de incubação por 5 minutos a temperatura ambiente e posterior leitura da emissão de fluorescência a 480nm de excitação e 520nm de emissão (JUNG et al., 2015).

5.5.3 Quantificação de indicadores oxidativos

Para análise dos níveis de estresse oxidativo, foram empregados os seguintes testes: Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) que mede a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente H₂O₂, o teste foi realizado conforme Halliwell e Whiteman (2004); Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) que mede lipoperoxidação, através deste método avalia-se a peroxidação lipídica conforme Jentzsch et al (1996), carbonilação de proteínas (CP) causada pelo estresse oxidativo que leva a fragmentação das cadeias de proteínas e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos com produção frequente de compostos carbonilados. Esses danos serão mensurados pela determinação de

formação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilidrazina, como previamente descrito por Morabito e colaboradores (2004); bem como Oxido Nítrico (ON), que foi avaliado pelos níveis de nitrato, utilizando o reagente de Griess (ALLO, 2012).

5.5.4 Análise da expressão gênica de citocinas inflamatórias

Uma análise complementar da expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10 foi conduzida. O gene da *beta-actina* foi utilizado como *housekeeping*. A avaliação da expressão gênica foi realizada a partir da extração do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) das amostras com trizol, em seguida o mRNA foi convertido em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), usando a transcriptase reversa, e finalmente, o cDNA foi utilizado para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), conforme os primers de iniciação utilizados, descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos primers que serão utilizados para análise de expressão gênica.

<i>Genes</i>	<i>Primers</i>	
	Sense	Antisense
β actina	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA
IL-1 β	GCGGCATCCAGCTACGAAT	ACCAGCATCTTCCTCAGCTTGT
IL-6	TACCCCAGGAGAAGATTCCA	CCGTGCGAGGATGTACCGAATT
IL-10	GTGATGCCCCAAGCTGAGA	TGCTCTTGTTTTACAGGGAAG
TNF- α	CAACGGCATGGATCTCAAAGAC	TATGGGCTCATACCAGGGTTTG

5.6 Instrumentos de medidas neuropsicológicas

As pacientes foram submetidas aos testes neuropsicológicos duas vezes: uma hora antes do início da quimioterapia, nos 2º ciclo e 4º ciclo de quimioterapia, com intervalos de 42 dias. Os testes foram aplicados pela mesma pesquisadora.

Analisamos a presença de sintomas de ansiedade (Inventário de Ansiedade de Beck – BAI), sintomas de depressão (Inventário de Depressão de Beck II- BDI-II), funções executivas (Teste Wisconsin de Classificação de Cartas – WCST), apoiados pelos subtestes Dígitos e Procurar Símbolos das Escala de Inteligência Wechsler para Adultos III (WAIS-III).

5.6.1 Inventário de Ansiedade de Beck (BAI)

Esta escala foi utilizada para medir a intensidade de sintomas de ansiedade através de 21 itens, cujo somatório permite a seguinte classificação: ansiedade mínima (zero-10); leve (11 a 19); moderada (20 a 30) e grave (31 a 63). As pacientes responderam aos 21 itens de acordo com a presença ou não de sintomas / sinais para ansiedade, nas três últimas semanas, que deveriam ser marcados como: absolutamente não; levemente (não me incomodou muito); moderadamente (foi muito desagradável, mas pude suportar) ou gravemente (dificilmente pude suportar). O tempo de aplicação foi de aproximadamente 10 minutos.

5.6.2 Inventário de Depressão de Beck II (BDI-II)

Este instrumento é composto por 21 itens, cujo objetivo é estimar a gravidade global da depressão em pessoas a partir dos 10 anos até a terceira idade. Além de refletir sintomas afetivos e cognitivos, reflete também sintomas somáticos e vegetativos de depressão (BECK; STEER; BROWN, 2011).

O BDI-II teve a finalidade de rastreamento para identificar sintomas depressivos, nas últimas três semanas. A sensibilidade do teste é considerada mais importante que sua especificidade. Portanto, são sugeridos os pontos de corte: mínimo (zero-13); leve (14-19); moderado (20-28) e grave (29-63). O teste demonstra alta confiabilidade teste-reteste com uma semana de intervalo (r de Person = 0,93) (BECK; STEER; BROWN, 2011; PARANHOS, ARIGON, WERLANG, 2010). O tempo de aplicação foi de aproximadamente 15 minutos.

5.6.3 Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (WCST)

Para avaliar função executiva, foi aplicado o WCST que é um instrumento para avaliação neuropsicológica da capacidade do indivíduo raciocinar abstratamente e modificar suas estratégias cognitivas como resposta a alterações nas contingências ambientais (TRENTINI et al., 2006). Avalia ainda a capacidade de controle inibitório, memória de trabalho e flexibilidade cognitiva (DIAMOND, 2013). O foco do estudo esteve, principalmente, na avaliação da flexibilidade cognitiva e do controle inibitório, uma vez que para a amostra avaliada, nos interessou o quanto a paciente dispunha de flexibilidade cognitiva para adaptação a nova realidade (diagnóstico e tratamento) e condições de tomada de decisão, necessárias para autonomia no planejamento do tratamento. O controle inibitório também foi foco deste estudo, considerando sua importância em abandonar hábitos antigos de vida e se readaptar a hábitos saudáveis e necessários durante o tratamento.

O WCST é composto de dois baralhos idênticos com 64 cartas cada (totalizando 128 cartas) e quatro cartas-estímulo, fornecendo escores quanto aos acertos, assim como apontando fontes de dificuldade nas tarefas. As cartas estímulo, contendo cores (vermelho, verde, amarelo e azul), formas geométricas (triângulo, estrela, cruz e bolas) e quantidades diferentes (1, 2, 3 e 4 respectivamente). As cartas-estímulo foram dispostas da esquerda para a direita do avaliado (1 triângulo vermelho, 2 estrelas verdes, 3 cruces amarelas e 4 bolas azuis) e entregue o primeiro baralho contendo 64 cartas. A paciente foi orientada a dispor essas 64 cartas abaixo das cartas-estímulo que melhor lhe conviesse, recebendo somente a instrução da pesquisadora de que a associação estava correta ou incorreta. Ela deveria completar sequências de 10 acertos para cores, 10 acertos para forma e 10 acertos para números de figuras com o primeiro baralho e sucessivamente, da mesma maneira, com o segundo baralho. O tempo aproximado da aplicação variou em média 20 minutos.

Para análise dos dados, utilizamos o escore z para número de categorias completadas e erros perseverativos, em que o foco de interpretação é o desempenho do paciente em relação a indivíduos neurologicamente intactos. Para propósitos diagnósticos, recomenda-se a interpretação a partir dos escores normativos corrigidos demograficamente, fornecendo o desempenho do avaliado em relação a sua idade (CUNHA, et al. 2005). Como não há escores normativos para população acima de 17 anos e 11 meses validados no Brasil, adotou-se os pontos de corte da amostra americana.

Segundo a metodologia dos autores americanos, o instrumento pode ser reaplicado após um mês de intervalo, sem perda das propriedades psicométricas (CUNHA, 2005; MIGUEL, 2005).

5.6.4 Escala Wechsler de Inteligência para Adultos (WAIS): Subteste Dígitos

Este subteste é composto de duas tarefas que são aplicadas uma independente da outra: Ordem Direta e Ordem Inversa. Em ambas as tarefas, a pesquisadora lê em voz alta, uma sequência de números para a voluntária da pesquisa. Para cada item da ordem Direta, a voluntária teve que repetir a sequência numérica na mesma ordem apresentada. Para cada item da ordem Inversa, a voluntária teve que repetir a sequência numérica na ordem contrária à apresentada pela pesquisadora. O tempo de aplicação foi de aproximadamente 5 minutos. Dígitos na ordem direta avaliou a capacidade de retenção da memória imediata e os dígitos na ordem inversa mediram a memória de trabalho e a capacidade de reversibilidade. Escores baixos em dígitos, principalmente na ordem inversa, aparece, normalmente, em pessoas que

não são capazes de dispensar atenção necessária à resolução de tarefas mentais mais complexas.

Os dados do subteste dígitos foram analisados pelo escore ponderado, com a média de (M=10) e desvio padrão (DP \pm 3) conforme instruções contidas no manual para administração e avaliação, com adaptação e padronização para amostras brasileiras de Elizabeth do Nascimento (WECHSLER, 2004).

5.6.5 Escala Wechsler de Inteligência para Adultos (WAIS): Subteste Procurar Símbolos

Este subteste avalia a habilidade fluida, velocidade de processamento, organização perceptual, velocidade de operação mental, velocidade psicomotora, atenção, concentração, memória visual de curto prazo, coordenação visual-motor e flexibilidade cognitiva. Sendo uma medida adequada para a inferência da habilidade cognitiva global. Para cada item deste subteste, a voluntária analisou, visualmente, dois grupos de símbolos: um grupo modelo (composto de dois símbolos) e um grupo de procura (composto de cinco símbolos) indicando se um dos símbolos do grupo modelo, também faziam parte do grupo procura. Logo a seguir, a voluntária respondeu ao maior número de itens (linhas) possíveis, dentro de um tempo limite de 120 segundos.

Os dados do subteste procurar símbolos foram analisados pelo escore ponderado, com a média de (M=10) e desvio padrão (DP \pm 3), conforme instruções contidas no manual para administração e avaliação, com adaptação e padronização para amostras brasileiras de Elizabeth do Nascimento (WECHSLER, 2004).

5.7 Aspectos éticos

O presente estudo foi desenvolvido a partir de um projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (código SIPESQ - 7675).

Devidamente cadastrado na Plataforma Brasil sob o (CAAE) - 81442717.8.0000.5336.

O estudo está de acordo com a Resolução CNS n. 466/2012.

Todas as pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.8 Análise Estatística

Os resultados foram inicialmente tabulados em planilha eletrônica Excel e posteriormente analisados utilizando o programa estatístico R-studio (v.10.136) e pelo SPSS (v. 22.0).

O Teste de Kolmorov-Smirnof foi utilizado para averiguar se as variáveis quantitativas tinham distribuição normal. Como a maior parte das variáveis não tinha distribuição normal, todas as demais comparações estatísticas foram feitas com testes não-paramétricos.

Os dados neuropsicológicos foram assim tratados: mulheres que apresentaram déficit executivo em pelo menos um dos dois parâmetros do WCST analisados (categorias completadas e erros perseverativos) em pelo menos um dos ciclos de quimioterapia analisados (2º e 4º ciclo) foram agrupadas na categoria denominada “déficit executivo” (DE). Aquelas mulheres que não apresentaram nenhuma alteração cognitiva avaliada pelo teste WCST foram agrupadas na categoria denominada “sem déficit cognitivo” (SDE).

A partir desta categorização foi possível analisar a associação entre as mesmas com a idade, nível educacional, indicadores de humor (ansiedade e depressão), outras alterações cognitivas observadas pelos subtestes do WAIS, e modulação dos marcadores oxidativos e de citotoxicidade antes da quimioterapia, aproximadamente 4 horas depois da quimioterapia.

Para as análises de associação entre o *status* cognitivo e os marcadores oxidativos e de citotoxicidade, o tratamento dos dados neurocognitivos foram inicialmente tabulados em planilha eletrônica Excel e posteriormente convertidos em formato *Comma-separated values* (CSV) para análise no Programa Estatístico R-Studio (v.1.0.136).

Com o objetivo de aferir as reais variações individuais de retestagem, foi utilizado um índice de mudança confiável (RCI), teste estatístico que melhor verifica a mudança confiável após uma intervenção, retirando artefatos e erros de medida, como os efeitos de prática e aprendizagem. Para isso, as variáveis foram padronizadas de acordo com os dados normativos de uma população controle e convertidas em *escore-z*. De forma geral, a variação individual foi subtraída da variação média do grupo e esse resultado dividido pelo erro padrão da diferença entre as duas medidas. Assumiu-se um intervalo de confiança de 90% e índices de RCI ($>1,645$) considerados melhora confiável, ($-1,645 > \text{RCI} < 1,645$) estabilidade cognitiva e ($< -1,645$) piora confiável na função avaliada.

Para mudanças cognitivas grupais, foi realizado um teste de *Sapiro-Wilk*, a fim de verificar a distribuição das variáveis da amostra. Para comparação da mudança grupal dos escores dos instrumentos neuropsicológicos nos períodos prévios e posteriores ao ciclo quimioterápico. Utilizou-se o teste paramétrico *t* de *Student* nas variáveis com distribuição normal.

Após a categorização dos dados neurocognitivos, a comparação das variáveis qualitativas foi feita por teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher enquanto a comparação das variáveis quantitativas foi feita por teste de comparação de medidas independentes de *Wilcoxon-Mann-Whitney*. Como os dados não possuíam distribuição normal, os resultados foram apresentados sob a forma de frequência relativa (%) ou pela descrição da mediana. Por fim, uma análise de regressão logística (Backward Wald) foi conduzida para averiguar se a associação entre variáveis oxidativas e citotóxicas e desenvolvimento de déficit executivo estariam sendo influenciadas pela idade, grau de instrução e esquema quimioterápico. Todas as associações com $p > 0.05$ foram consideradas significativas.

6. RESULTADOS

A presente investigação incluiu inicialmente 40 mulheres, entretanto somente 30 (75%) completaram todas as etapas e foram consideradas na análise dos resultados. A média de idade das mulheres incluídas no estudo foi de $53,5 \pm 10,1$ anos.

As demais características são apresentadas na Tabela 2.

Em relação ao subtipo molecular de câncer, ocorreu maior prevalência de mulheres com o tipo Luminal A. Como as mulheres incluídas no estudo apresentaram diversos níveis de estadiamento TNM e esquemas quimioterápicos utilizados, tais esquemas foram categorizados em dois grupos: os quais incluíam uso de antraciclina e os que não incluíam o uso deste quimiofármaco. No caso, a maioria dos esquemas incluíam uso de antraciclina (66,6%).

Tabela 2 Características gerais das pacientes		
Variáveis		n (%)
Estado Civil	Solteira	02 (6,7)
	Casada / União estável	20 (66,6)
	Separada/divorciada	03 (10,0)
Escolaridade (anos)	Até 8	07 (23,3)
	Até 11	08 (26,6)
	Até 16	10 (33,3)
	Acima de 16	04 (13,3)
Status Menopausal	Pré-menopausa	14 (47,0)
	Pós-menopausa	16 (53,0)
Tipo de tratamento	Adjuvante	22 (73,0)
	Neoadjuvante	08 (27,0)
Subtipos moleculares	Luminal A	10 (33,3)
	Luminal B	08 (26,7)
	HER-2	08 (26,7)
	Tripla negativo	04 (13,3)
Estadiamento TNM	IA	04 (13,3)
	IIA	10 (33,3)
	IIB	02 (6,7)
	IIIA	07 (23,3)
	IIIB	03 (10,0)
	IIIC	01 (3,3)
	IV	03 (10,0)
Esquemas quimioterápicos*	Antraciclina	
	AC	13 (43,3)
	EC	06 (20,0)
	TAC	01 (3,3)
	Não-Antraciclina	
	TCH	02 (6,7)
	TC	04 (13,3)
CMF	01 (3,3)	

	Outros	03 (10,0)
Ansiedade – 2º Ciclo	Leve/Moderada	11 (36,7)
4º Ciclo	Leve/Moderada	04 (13,3)
Depressão – 2º Ciclo	Leve/Moderada	06 (20,0)
4º Ciclo	Leve/Moderada	08 (26,7)

*Esquema quimioterápico : AC (doxorubicina + ciclofosfamida); EC (epirrubicina + ciclofosfamida); TAC (docetaxel + doxorubicina + ciclofosfamida); FAC (fluorouracil + doxorubicina + ciclofosfamida); TC (docetaxel + ciclofosfamida); TCH (docetaxel + carboplatina + trastuzumab); CMF (ciclofosfamida + metotrexate + fluorouracil); Outros (paclitaxel + zometa e paclitaxel + carboplatina);

Status Cognitivo

A tabela 3 apresenta a variação da mudança grupal para aspectos neuropsicológicos. Observa-se que o teste WCST, na área de categorias completadas, apresenta significância estatística de $p=0,0275$. Já a tabela 4, quando aplicado o RCI para mudança confiável, observa que individualmente, as pacientes apresentam estabilidade cognitiva, o que se mantém igual na mudança de classificação (tabela5).

Tabela 3 – Características Neuropsicológicas - Mudança Grupal

Teste	(2º ciclo)	(4º ciclo)	<i>p-Valor t-test</i>
	M (DP)	M (DP)	M (DP)
BAI	8,6 (±8,1)	8,6 (±9,7)	0,9941
BDI-II	6,5 (±6,1)	7,8 (±7,3)	0,4572
WCST – Categorias Completadas	3,1 (±2,2)	4,3 (±1,9)	0,0275*
WCST – Percentual de Erros Perseverativos	25 (±18,7)	18,4 (±13,7)	0,1243

* $p<0,05$

Tabela 4 – *Reliable Change Index* (RCI) - Mudanças Individuais

Teste	Piora	Estabilidade	Melhora
	n (%)	n (%)	n (%)
BAI	2 (7)	25 (83)	3 (10)
BDI-II	2 (7)	26 (86)	2 (7)
WCST – Categorias Completadas	2 (7)	25 (83)	3 (10)
WCST – Percentual de Erros Perseverativos	2 (7)	26 (86)	2 (7)

Tabela 5 – Mudança Clínica (mudança de classificação)

Teste	Piora	Estabilidade	Melhora
	n (%)	n (%)	n (%)
BAI	2 (7)	24 (80)	4 (13)
BDI-II	1 (3)	27 (90)	2 (7)
WCST – Categorias Completadas	3 (10)	19 (63)	8 (27)
WCST – Percentual de Erros Perseverativos	4 (13)	20 (67)	6 (10)

A Tabela 6 apresenta os escores médios gerais em relação ao teste de função executiva (FE), considerando as seguintes categorias: categorias completadas (CA) e erros perseverativos

(PE). A comparação entre estes resultados em mulheres no 2º e 4º ciclo da quimioterapia mostrou diferenças significativas. No caso, os resultados apontaram para uma melhora nos escores encontrados no 4º ciclo em relação ao 2º.

Tabela 6 Principais escores do Teste Wisconsin de Classificação de Cartas como marcador de função executiva em mulheres com câncer de mama durante a realização do 2º e 4º ciclos de quimioterapia

Testes	Ciclos Quimioterapia				p
	2º		4º		
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana	
WSCT					
Categorias Completadas	3,1 ± 2,1	3,0	4,3 ± 1,91	5,0	0,001
Erros Perseverativos	25,0 ± 18,7	19,0	18,4 ± 13,7	15,5	0,007
Categorias Comp. Percentil	- 1,2 ± 1,1	- 1,2	- 0,57 ± 1,2	- 0,4	0,01
Erros Pers. Percentil	- 2,0 ± 3,95	- 0,7	- 0,58 ± 1,18	-0,5	0,02
WAIS					
Símbolos	13,3 ± 2,3	11,0	13,6 ± 2,5	14,0	0,25
Dígitos	11,1 ± 2,5	13,0	11,3 ± 2,4	11,0	0,659

Entretanto, como existiu uma grande variação intra-individual nos resultados obtidos, uma análise complementar foi conduzida no qual as mulheres foram categorizadas “com” e “sem” déficit executivo, considerando o número de categorias completadas e o número de erros perseverativos. Uma diminuição significativa de mulheres com déficit executivo avaliado pela categoria completada foi observada no 4º ciclo em comparação com os resultados obtidos no 2º ciclo. Por outro lado, a frequência de mulheres com déficit executivo avaliado pelos erros perseverativos não apresentou diferenças significativas entre os resultados obtidos no 2º e 4º ciclos (Figura 3A).

A partir destes resultados ainda foi avaliado a frequência de mulheres que se mantiveram sem déficit cognitivo nos testes conduzidos em ambos os ciclos, mulheres que apresentaram déficit executivo nas duas avaliações, e quais foram aquelas que apresentaram déficit somente no 2º ciclo ou somente no 4º ciclo. Como pode ser observado na Figura 3, apenas 30,0% das mulheres não apresentaram déficit executivo em CA em ambos os ciclos, enquanto em EP a ausência de déficit em ambos os ciclos foi observada em 36,7% das mulheres.

Estes resultados permitiram identificar que apenas um número bastante limitado de mulheres (Figura 3C) que não tiveram nenhum tipo de déficit executivo em nenhuma das duas categorias avaliadas aqui (CA e PE) e nos dois ciclos em que o instrumento foi aplicado.

A análise de indicadores de memória de trabalho e velocidade de processamento feita através da aplicação dos subtestes WAIS (procurar símbolos e dígitos) não mostrou diferenças significativas entre os dois ciclos e apresentou valores medianos similares a população em geral. Por este motivo, estes dois indicadores não foram incluídos na identificação de mulheres com déficit executivo, que foi anteriormente realizada via aplicação do teste WSCT.

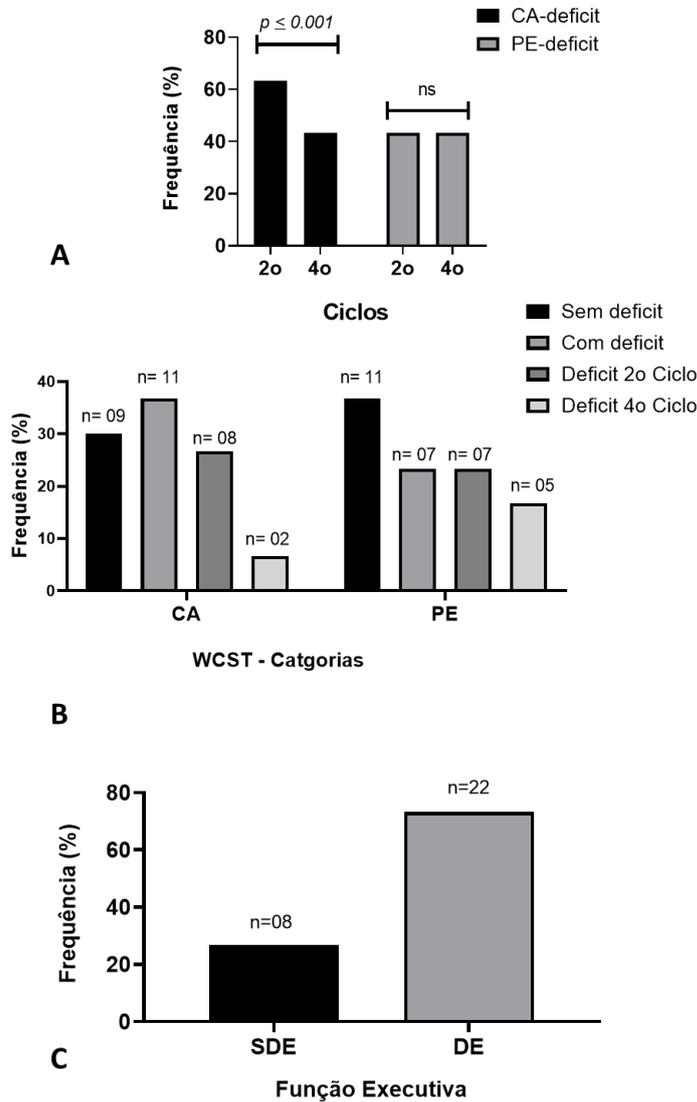


Figura 3 Frequência de déficit executivo determinada pelo teste WCST em mulheres com câncer de mama no 2º e 4º ciclos de quimioterapia. As seguintes categorias foram utilizadas para determinar o déficit cognitivo: CA = categorias completadas e PE = erros perseverativos. SDE = mulheres sem nenhum tipo de declínio executivo e DE = mulheres com declínio cognitivo em pelo menos um dos dois ciclos de quimioterapia e em uma das variáveis analisadas (CA e PE) do teste WCST. Comparações entre os ciclos mostrados na Figura 3A foram feitas por teste não paramétrico Exato de Fisher.

Como houve variação da disfunção executiva entre as mulheres, optou-se por comparar a potencial influência de variáveis sociodemográficas, psicométricas e oxi-inflamatórias entre os dois grupos compostos por mulheres sem déficit executivo (SDE) e mulheres com algum

déficit executivo (DE), identificado em pelo menos um dos ciclos de quimioterapia, ou em pelo menos uma das categorias do teste de WSCT.

A comparação entre estes dois grupos não mostrou influência significativa com a idade, ainda que o valor de p tenha ficado no limite da significância ($p=0,77$). O nível de escolaridade, estado civil, status menopausal, histórico prévio de cirurgia também não apresentaram associação significativa entre estes dois grupos de mulheres.

A ansiedade e a depressão avaliadas nos 2º e 4º ciclos também não apresentaram influência significativa entre mulheres pertencentes aos grupos SDE e DE.

Considerando estas duas categorias, foi avaliado se indicadores plasmáticos de resposta tóxico-inflamatória relacionada com a aplicação do quimioterápico poderiam apresentar associação com o DE independente do ciclo ou da categoria do teste de WCST aqui avaliado.

Considerando que, apesar das CMSPs não serem as células-alvo dos quimioterápicos, por se tratar de fármacos altamente potentes, um impacto inicial nos níveis de indicadores pré-inflamatórios associados ao metabolismo oxidativo foram aqui avaliados. Os resultados são sintetizados na Tabela 7. Nesta análise os marcadores foram medidos imediatamente antes das mulheres iniciarem o 1º ciclo de quimioterapia e 4 horas após o término da primeira dose de quimioterapia. Uma vez que a ação do quimioterápico sobre os marcadores poderia ser observada nas próximas 24 horas, culturas de CMSPs do sangue das mulheres antes e depois de receberem o quimioterápico também foram analisadas.

Os níveis de dsDNA em CMSPs cultivados durante 24 horas foram significativamente maiores em mulheres do grupo DE do que no grupo SDE. Em culturas de 24 h de CMSP, a presença do quimioterápico, mulheres do grupo DE também apresentaram níveis elevados de lipoperoxidação (que indica estresse oxidativo e disfunção celular) do que as mulheres do grupo SDE. Já o único marcador sanguíneo antes do uso do quimioterápico, que apresentou diferenças significativas entre os dois grupos, foram os níveis de ON. Entretanto, ao contrário do que seria esperado em condições normais, no qual em presença de agentes inflamatórios ocorreu indução e aumento dos níveis de ON, o grupo de DE apresentou níveis menores deste marcador em relação ao grupo SDE.

Tabela 7 Comparação de modulação de variáveis oxi-inflamatórias entre mulheres com e sem déficit executivo (DE e SDE) determinado pelo WCST ao longo do 2º e 4º ciclos de quimioterapia

Variáveis		Marcadores oxi-inflamatórios			
		Sangue sem quimioterapia	Sangue 4 horas pós a quimioterapia	Cultura de Células (24 h) sem quimioterapia	Cultura de Células (24 h) pós a quimioterapia
		Mediana	Mediana	Mediana	Mediana
dsDNA	SDE	117,8	121,5	124,5	124,4
	DE	122,0	124,9	232,6	196,2
	<i>p</i>	<i>0,606</i>	<i>0,961</i>	0,03	0,04
ON	SDE	0,173	0,106	0,86	0,80
	DE	0,118	0,98	0,82	0,79
	<i>p</i>	0,012	<i>0,264</i>	<i>0,083</i>	<i>0,253</i>
EROS	SDE	362,2	368,4	629,7	711,9
	DE	305,1	369,0	686,4	661,6
	<i>p</i>	<i>0,185</i>	<i>0,344</i>	<i>0,393</i>	<i>0,597</i>
LP	SDE	0,09	0,10	0,01	0,01
	DE	0,22	0,24	0,04	0,04
	<i>p</i>	0,219	0,393	0,298	0,03
CP	SDE	0,022	0,021	0,015	0,014
	DE	0,029	0,022	0,017	0,018
	<i>p</i>	<i>0,684</i>	<i>0,905</i>	<i>0,185</i>	<i>0,277</i>
Cell Viability*	SDE			0,462	0,476
	DE			0,367	0,298
	<i>p</i>			<i>0,281</i>	0,018

SDE= sem declínio executivo; DE= declínio executivo. Os dois grupos foram comparados por teste não-paramétrico de duas amostras independentes de Wilcoxon, Mann-Whitney que é similar ao teste Student-t para amostras com distribuições paramétricas. ds-DNA = concentração de níveis de fragmentos de DNA dupla-fita que indica atividade inflamatória no plasma ou no meio sobrenadante das culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de 24 h; ON= óxido nítrico cujos níveis estão associados a resposta inflamatória; ROS= espécies reativas de oxigênio cuja elevação na concentração está associada ao estresse oxidativo; LP = lipoperoxidação associada a alterações e disfunção da membrana da célula e das organelas; CP= carbonilação de proteínas associada a alterações estruturais oxidativas de proteínas celulares. * = viabilidade celular medida indiretamente pelo ensaio do MTT que quantifica a atividade mitocondrial das células; Nível de significância $p < 0.05$

As culturas de CMSPs apresentaram viabilidade diferencial entre o grupo de mulheres do grupo SDE e DE. Em ambos os casos (cultura de células antes da administração do quimioterápico e 4 h depois da administração) a viabilidade celular do grupo DE foi menor do que o grupo SDE. Entretanto, após a administração este efeito foi mais intenso, já que em comparação com o grupo DE a viabilidade celular do grupo SDE foi apenas 62%.

Uma análise complementar foi conduzida com o intuito de observar se a exposição ao quimioterápico induziria aumento na expressão gênica de citocinas inflamatórias (Figura 4). Para tanto, foi feita a comparação entre a expressão destes genes em culturas de CMSPs de 24 horas.

Quando a expressão gênica das citocinas de células coletadas antes e depois da quimioterapia foi comparada, a grande maior parte das mulheres apresentou superexpressão do gene IL-1 β (60,0%, n=18), superexpressão do gene IL-6 (76,7%, n=23), superexpressão do gene TNF α (76,7%, n=23). Também foi observada superexpressão do gene da citocina anti-inflamatória IL-10 (40,0%, n=12) ainda que este efeito tenha sido em menor número de mulheres.

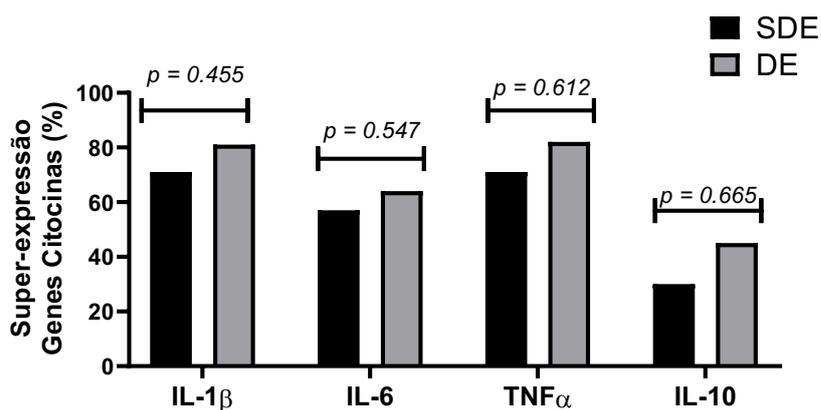


Figura 4 Comparação da frequência de mulheres do grupo DE com superexpressão de genes de citocinas inflamatórias (> 1,5 vezes em relação ao grupo SDE) avaliada em culturas de 24 horas de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) obtidas de amostra de sangue após 4 horas da primeira administração do quimioterápico. A comparação foi feita por teste Exato de Fisher. Resultados mostraram aumento significativo na expressão das citocinas tanto nas mulheres do grupo SDE quanto do grupo DE.

Com base nestes resultados, foi conduzida uma comparação da frequência de superexpressão de citocinas inflamatórias entre os grupos de mulheres SDE e DE. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os mesmos.

Como o tamanho amostral ficou reduzido, não foi possível realizar análise multivariada complementares para verificar potencial influência da idade, grau de instrução, ansiedade, depressão e esquema terapêutico contendo antraciclinas nos resultados obtidos.

Por fim, foi conduzida uma análise de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para averiguar se alguma das variáveis oxidativas associadas ao déficit executivo poderia apresentar valor preditivo (Figura 5). No caso, os níveis de LP foram os que apresentaram valor preditivo [área sobre a curva (AUC) = 0,744]. Em culturas de CMSPs obtidas após 4 h da primeira exposição ao quimioterápico, uma concentração de 0,10 de TBARS possui sensibilidade de 0,82 e especificidade de 0,63% de detecção de pacientes com potencial de desenvolver déficit cognitivo.

Mulheres com concentrações elevadas de LP medidas em culturas de CMSPs obtidas após 4 horas da aplicação do primeiro ciclo de quimioterapia apresentaram um risco relativo

(RR) para desenvolver déficit executivo precoce 3,43 vezes maior (intervalo de confiança a 95% de 1,22-9,68) do que mulheres com concentrações de LP menores que 0,1.

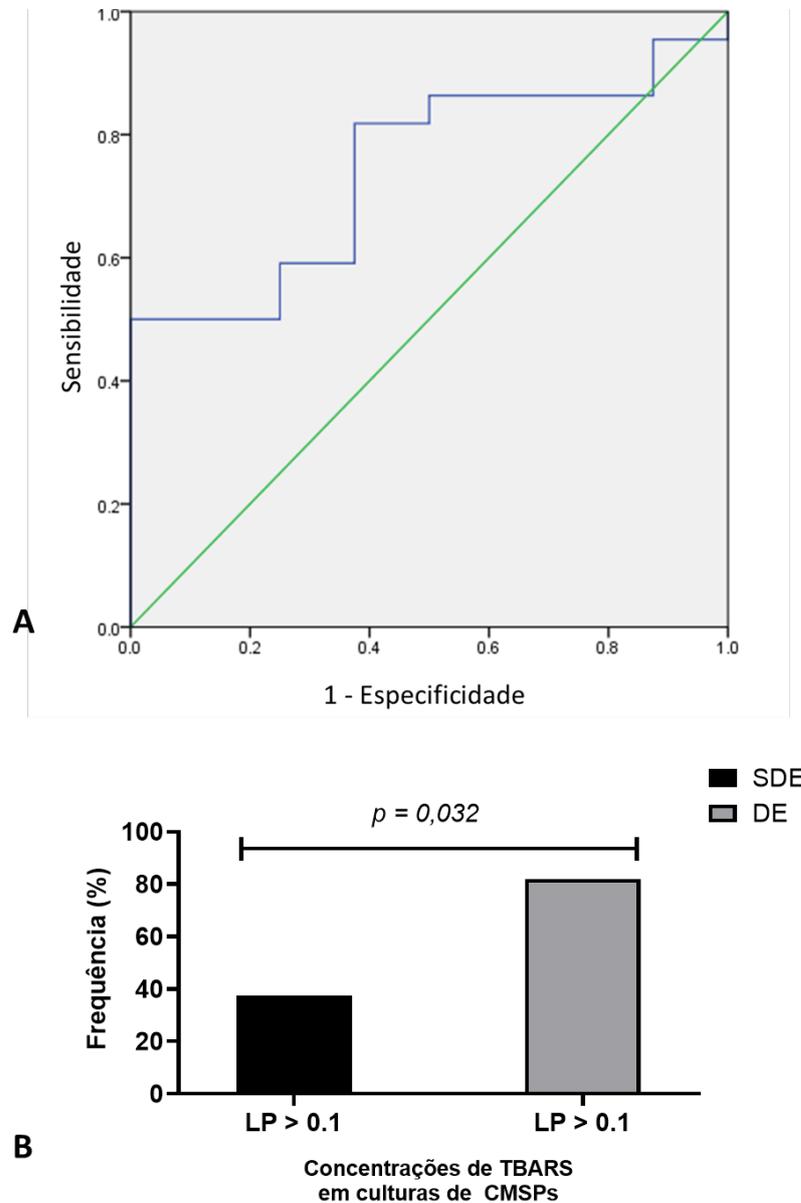


Figura 5 Associação entre níveis elevados de lipoperoxidação (LP) em culturas de 24 h de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) obtidas de amostra de sangue de mulheres com câncer de mama após a 1ª exposição ao quimioterápico. (A) Gráfico da curva ROC determinando o valor preditivo dos níveis de lipoperoxidação; (B) Comparação de mulheres com CMSPs com níveis de LP > 0.1 pelo teste exato de Fisher.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou identificar potencial influência de marcadores do estresse oxidativo, modulados pela primeira exposição do sangue ao quimioterápico, no desenvolvimento de indicadores precoces de déficit executivo em mulheres com câncer de mama. O conjunto geral dos resultados mostrou algumas alterações nos níveis de marcadores oxidativos, principalmente da lipoperoxidação, sugerindo que a toxicidade causada pela exposição imediata ao quimioterápico poderia ser um indicador de risco de desenvolvimento de déficit executivo a curto prazo (ainda no período da quimioterapia). A seguir serão discutidos em maior detalhes os principais resultados aqui obtidos e a sua potencial relevância clínica.

Inicialmente, é preciso salientar que na condução deste estudo, foi confirmada a alta prevalência de indicadores de déficit executivo (73,3%) em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia. Corroborando com os achados da literatura, que, segundo Yang e Hendrix (2018) até 75% dessas mulheres sofrem de comprometimento cognitivo relacionado a doença, incluindo efeito colateral induzido pelo tratamento quimioterápico.

As pacientes com câncer de mama recebem diferentes tratamentos, e esses tratamentos geralmente resultam em déficits físicos ou cognitivos nas pacientes. Neste contexto, outros autores propõem que uma faixa de 15 a 50% dos pacientes com tumores malignos apresentarão comprometimentos cognitivos persistentes após a quimioterapia (VARDY *et al.*, 2007). Estudos complementares, como o realizado por Li *et al.* (2018) comprovaram ocorrência de alterações estruturais cerebrais induzidas pela quimioterapia, via análise de ressonância magnética funcional. Esta investigação também descreveu associação entre alterações nas redes cerebrais estruturais e déficits neuropsicológicos em mulheres sobreviventes de câncer de mama.

De fato, desordens cognitivas, incluindo habilidades de memória, atenção, velocidade de processamento de informação e função executiva podem ser vistas em pacientes com câncer, principalmente quando a doença está em estado avançado. As principais causas de comprometimento cognitivo em pacientes com câncer, ainda não são claras e podem estar associadas à transtornos de humor, em especial a depressão ou mesmo aos fármacos utilizados na quimioterapia (DAVIS *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014; KESSLER *et al.*, 2014).

Em relação ao efeito da quimioterapia, este poderia ocorrer via alterações no metabolismo oxidativo e inflamatório. Muita atenção tem sido dada ao papel inflamatório no desencadeamento de déficit executivo induzido por quimioterápicos. Por exemplo, um estudo longitudinal, conduzido por Alfano *et al.* (2017), avaliou 209 mulheres com câncer de mama e

106 saudáveis (controle), no qual foram quantificados alguns fatores pro-inflamatórios como a IL-1, IL-6 e TNF α . Esta avaliação foi conduzida 6 e 18 meses após o tratamento do câncer. Os valores basais destes marcadores foram similares entre as pacientes e o grupo controle. Entretanto, nas sobreviventes que realizaram cirurgia, radioterapia e quimioterapia ocorreu um aumento significativo nos níveis das citocinas pro-inflamatórias (ALFANO *et al.*, 2017; CHEUNG *et al.*, 2015).

Investigações prévias têm sugerido que padrões alterados inflamatórios poderiam estar associados com disfunção cognitiva presente em mulheres com câncer de mama e quimioterapia. Por exemplo, Hayslip *et al.*, (2015) descreveram a ocorrência de aumento dos níveis de TNF- α pós-quimioterapia relacionada às queixas cognitivas em sobreviventes de câncer de mama, possivelmente por oxidação de proteínas plasmáticas. Assim, parece que, o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel intermediário na disfunção cognitiva pós-quimioterapia. Em um grande estudo de coorte em Cingapura com 99 sujeitos, foram encontradas concentrações elevadas de IL-6 e IL-1 β em pacientes com pior desempenho de velocidade de processamento e outras alterações cognitivas (CHEUNG *et al.*, 2015).

Em estudo que examinou as relações entre quimioterapia adjuvante e citocinas pró-inflamatórias, metabolismo cerebral regional e queixas cognitivas em pacientes com câncer de mama em estágio inicial, foram incluídas 33 pacientes que completaram o tratamento inicial, utilizando Fluorodesoxiglicose – Tomografia por Emissão de Pósitrons (FDG-PET) marcadores de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , sTNF-RII, CRP e IL-6) e avaliação de queixas cognitivas no início do tratamento e um ano mais tarde. O metabolismo no córtex pré-frontal medial e córtex temporal anterior correlacionou-se tanto com queixas de memória quanto níveis de citocinas (POMYKALA *et al.*, 2013).

As relações entre os níveis de citocinas (IL-6, IL-8 e MCP-1) e o tipo de quimioterapia também foram avaliadas antes do 2º ciclo e após dois ciclos de quimioterapia consecutivos (ciclo 4) em 54 pacientes com câncer de mama em estágio inicial, que receberam AC / FAC ou CMF. Os níveis de IL-6, IL-8 e MCP-1 aumentaram no grupo AC/FAC e diminuiu no grupo CMF. A única alteração significativa entre os grupos foi de IL-6 ($p < 0,05$). Estes resultados preliminares sugerem que o AC / FAC induziriam níveis aumentados de citocinas do que em CMF. As pacientes que recebem quimioterapia com base em doxorrubicina (com ciclofosfamida-AC, ou ciclofosfamida mais fluorouracil-FAC) ou ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracil (CMF) podem ter diferentes modos de ação, afetando diferentemente os níveis de citocinas (JANELSINS *et al.*, 2012). Portanto, acredita-se que estados de inflamação crônica

associados a quimioterapia poderiam contribuir para a evolução de efeitos colaterais como o declínio cognitivo em mulheres com câncer de mama.

Apesar da relevância da inflamação na consolidação do declínio cognitivo em mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia, um dos primeiros eventos desencadeados por estes fármacos diz respeito ao estabelecimento de estresse oxidativo e citotoxicidade em células saudáveis, em especial leucócitos, cardiomiócitos ou mesmo células do SNC. Segundo a revisão de Ren *et al.* (2019) sobre o tema, 50% dos fármacos anticâncer aprovados pela *Food Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, são agentes geradores de EROs e podem comprometer a barreira hematoencefálica via diversas rotas metabólicas, incluindo o estresse oxidativo.

Geralmente é o estresse oxidativo, dano de DNA e indução de morte das células (ou por apoptose ou necrose) é que são eventos que precedem a indução da resposta inflamatória (REN *et al.*, 2019). Este tipo de efeito colateral tem sido consistentemente descrito em relação ao uso de antraciclina como é o caso da doxorubicina. As antraciclina têm sido um dos pilares da terapia do câncer de mama há décadas. No entanto, as preocupações relativas a toxicidades a longo prazo despertaram o interesse em opções alternativas de terapia adjuvante com perfis de toxicidade mais favoráveis. Por exemplo, a doxorubicina é capaz de induzir estados de cardiotoxicidade via estresse oxidativo que aumenta as taxas de LP, dano de DNA, distúrbios na homeostase do cálcio, entre outras (SONGBO *et al.*, 2019).

Como quimioterápicos são indutores de estresse oxidativo, sendo peças relevantes no estabelecimento de estados inflamatórios que predispõe a alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) (REN *et al.*, 2019). O estudo aqui realizado focou suas análises no potencial papel da sensibilidade de mulheres a modulação de marcadores do estresse oxidativo na primeira exposição ao quimioterápico.

A revisão da literatura não identificou, até o presente momento um estudo com este foco. Para tanto, a investigação realizou um protocolo que mesclou não somente a coleta de sangue e análise de marcadores oxidativos presentes no mesmo, mas também cultura de CMSPs a partir de amostras de sangue coletado antes da aplicação e 4 horas após a aplicação da primeira dose de quimioterapia. Esta estratégia possibilitou comparar o perfil oxidativo prévio e logo após a quimioterapia.

Mesmo as CMSPs permanecendo em cultura de 24 h, o impacto do quimiofármaco sobre marcadores do metabolismo oxidativo e viabilidade celular foi observado. Entretanto, este efeito foi mais intenso nas mulheres que, posteriormente apresentaram algum indicador de

déficit executivo avaliado no 2º e 4º ciclos. Por este motivo, os resultados obtidos mostram um potencial poder de predição do protocolo no desenvolvimento deste importante efeito colateral.

Apesar da associação ter sido observada em diversas variáveis citotóxicas e oxidativas, níveis elevados de LP foram os que apresentaram um poder regular de predição de risco ao desenvolvimento do déficit executivo. Segundo a revisão de Shichiri (2014) sobre o tema, o cérebro é extremamente sensível a danos oxidativos por vários motivos. Por um lado, o cérebro consome uma quantidade de concentração de oxigênio (cerca de 20%) para produzir energia. Além disso, várias áreas do cérebro, incluindo a substância nigra, o núcleo caudado, o putamen e o *globus pallidus*, são ricas em ferro. É geralmente aceito que o ferro se acumula no cérebro de indivíduos mais velhos, e os íons de ferro que são liberados após danos cerebrais podem catalisar reações de radicais livres. Assim, o cérebro *per se* é uma fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs). A geração de peróxido de hidrogênio dependente do complexo I nas mitocôndrias cerebrais é maior do que na mitocôndria do músculo esquelético. Por fim, as membranas neuronais são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), particularmente ácido araquidônico (AA), ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA). Estes PUFAs são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo devido à posse de ligações duplas insaturadas. Por essas razões, as células neurais são mais suscetíveis ao dano oxidativo quando comparadas a outros tecidos do corpo (SHICHIRI, 2014).

Neste contexto, é plausível supor que mulheres apresentam níveis elevados de LP já na exposição a primeira dose de quimioterápicos poderiam ter mais risco de desenvolvimento de déficit executivo ainda no período da quimioterapia. Entretanto, o impacto na intensidade e manutenção destes déficits vinculados a maior responsividade oxidativa ao quimioterápico é uma questão em aberto.

Uma vez que foi observado aumento nos níveis de expressão gênica das citocinas inflamatórias também é possível que esta maior responsividade oxidativa possa influenciar no estabelecimento de quadros neuroinflamatórios indutores do déficit executivo. Novamente, este é outro questionamento em aberto a ser respondido a partir de estudos complementares futuros.

Por fim é relevante comentar as limitações metodológicas deste trabalho. Dentre elas, a principal, seguramente, diz respeito ao baixo tamanho amostral do estudo. Esta condição impediu uma análise robusta de potenciais fatores intervenientes na associação entre os marcadores oxidativos e o desenvolvimento do déficit executivo. Entretanto, como foi conduzido um protocolo diferenciado, em que se mesclou análises clássicas de marcadores sanguíneos com cultura de células, acredita-se que esta limitação fica atenuada.

Outra limitação, diz respeito ao tempo de acompanhamento das mulheres em relação a ocorrência de declínio executivo (somente avaliada no 2º e 4º ciclo). Novamente, esta limitação esteve associada ao tempo limitado para o desenvolvimento do estudo, do qual os resultados só podiam ser analisados após a realização de todos os protocolos psicométricos, de cultura de células e bioquímico-moleculares. Assim, pode-se considerar este como um primeiro estudo exploratório do qual se usaria como estratégia metodológica de análise de resposta citotóxica e oxidativa das CMSPs antes e depois da 1ª dose do quimioterápico. Aqui é importante comentar que outros marcadores poderiam ter sido avaliados, incluindo análise de dano de DNA, marcadores de estresse fisiológico como o cortisol, hormônio adrenocorticotropico (ACTH) e hormônio desidroepiandrosterona (DHEA) e também citocinas inflamatórias. Entretanto, a quantidade de amostra biológica para a realização destes testes e restrições financeiras relacionadas a realização de imunoenaios limitaram o estudo a análise dos marcadores descritos aqui. Apesar destas limitações, é fato que respostas inflamatórias incluindo elevação nos níveis de citocinas seriam mais fáceis de serem avaliadas em culturas de CMSPs de 72 horas. Entretanto, este procedimento elevaria a chance de perda de amostras biológicas e de variação nas respostas obtidas. Por este motivo, a identificação de marcadores de risco, mais gerais e imediatos como é o caso da LP são bem mais relevantes.

Neste contexto, os resultados aqui apresentados abrem perspectivas para análises complementares que confirmem a potencial associação entre os marcadores oxidativos e o desenvolvimento do déficit executivo. Cabe salientar que as técnicas utilizadas são de fácil aplicação e baixo custo (por se tratar de culturas de células de 24 horas) e poderiam ser facilmente implantadas em laboratórios de análises clínicas.

8. CONCLUSÃO

A partir da observação e acompanhamento de mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia foi observado:

- a ocorrência de alta prevalência de déficits executivos ao longo dos primeiros ciclos de quimioterapia. Entretanto, alterações de memória de trabalho e velocidade de processamento não chegaram a ser significativas no período estudado;
- a prevalência de ansiedade e depressão leve a moderada foi baixa e não chegou a modificar significativamente entre o 2º e 4º ciclo de quimioterapia;
- não foi observada associação direta entre déficit executivo e idade, grau de instrução, ansiedade e depressão;
- marcadores oxidativos, associados ao desenvolvimento de déficit executivo, foram identificados. Entretanto, somente a LP mostrou-se um marcador preditor que aumentou o risco deste efeito colateral;
- apesar da quimioterapia elevar a expressão de citocinas inflamatórias de culturas de CMSPs, este resultado ocorreu tanto no grupo de mulheres SDE, quanto no grupo de mulheres DE, indicando que o desencadeamento inicial da resposta inflamatória não seria um elemento diferenciador entre os dois grupos.

REFERÊNCIAS

- ASHER, Arash. Cognitive Dysfunction Among Cancer Survivors. **American Journal Of Physical Medicine & Rehabilitation**, [s.l.], v. 90, n. 1, p.16-26, maio 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/phm.0b013e31820be463>.
- AHN, S.. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 24, n. 13, p.2623-2625, 1 jul. 1996. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/24.13.2623>.
- ALFANO, Catherine M. et al. Inflammatory Cytokines and Comorbidity Development in Breast Cancer Survivors Versus Noncancer Controls: Evidence for Accelerated Aging?. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.149-156, 10 jan. 2017. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2016.67.1883>.
- ALI, Khaled et al. Inactivation of PI(3)K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. **Nature**, [s.l.], v. 510, n. 7505, p.407-411, jun. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13444>.
- ANDO-TANABE, Noriko et al. Cognitive function in women with breast cancer receiving adjuvant chemotherapy and healthy controls. **Breast Cancer**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.453-462, 14 set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12282-012-0405-7>.
- BAGNALL-MOREAU, Ciara et al. Chemotherapy-Induced Cognitive Impairment Is Associated with Increased Inflammation and Oxidative Damage in the Hippocampus. **Molecular Neurobiology**, [s.l.], p.1-12, 15 abr. 2019. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-019-1589-z>.
- BARBISAN, Fernanda et al. Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 10, 20 out. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107299>.

BARTSCH, Rupert; BERGEN, Elisabeth. ASCO 2018: highlights in HER2-positive metastatic breast cancer. **Memo - Magazine Of European Medical Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.280-283, 11 out. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12254-018-0441-x>.

BECK, Aaron T.; STEER, Robert A.; BROWN, Gregory K.. **Manual do Inventário de depressão de Beck -BDI-II**. [s.i.]: Casa do Psicólogo, 2011. 172 p. ADAPTAÇÃO BRASILEIRA: GORENSTEIN, Clarice et al.

BLAMEY, R.w. et al. ONCOPOOL – A European database for 16,944 cases of breast cancer. **European Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.56-71, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2009.09.009>.

BOWER, Julianne E.; GANZ, Patricia A.. Symptoms: Fatigue and Cognitive Dysfunction. **Improving Outcomes For Breast Cancer Survivors**, [s.l.], p.53-75, 2015. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-16366-6_5.

BRUNO, Jennifer; HOSSEINI, S.m. Hadi; KESLER, Shelli. Altered resting state functional brain network topology in chemotherapy-treated breast cancer survivors. **Neurobiology Of Disease**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.329-338, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.07.009>.

CAPELETO, Dianni et al. The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. **Biogerontology**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.621-630, 10 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-015-9561-4>.

CHEUNG, Y. T. et al. Association of proinflammatory cytokines and chemotherapy-associated cognitive impairment in breast cancer patients: a multi-centered, prospective, cohort study†. **Annals Of Oncology**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.1446-1451, 28 abr. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv206>.

CHEUNG, Yin Ting et al. Effects of Chemotherapy and Psychosocial Distress on Perceived Cognitive Disturbances in Asian Breast Cancer Patients. **Annals Of Pharmacotherapy**, [s.l.],

v. 46, n. 12, p.1645-1655, dez. 2012. SAGE Publications.

<http://dx.doi.org/10.1345/aph.1r408>.

CHIOU, Shyh-shin et al. A cross-sectional follow-up study of physical morbidities, neurocognitive function, and attention problems in post-treatment childhood acute lymphoblastic leukemia survivors. **The Kaohsiung Journal Of Medical Sciences**, [s.l.], p.373-378, 26 mar. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/kjm2.12061>.

CHIRIAC, Valentina-fineta; BABAN, Adriana; DUMITRASCU, Dan L..

PSYCHOLOGICAL STRESS AND BREAST CANCER INCIDENCE: A SYSTEMATIC REVIEW. **Clujul Medical**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.18-26, jan. 2018. Clujul Medical.

<http://dx.doi.org/10.15386/cjmed-924>.

COLLINS, Barbara et al. Persistent Cognitive Changes in Breast Cancer Patients 1 Year Following Completion of Chemotherapy. **Journal Of The International Neuropsychological Society**, [s.l.], v. 20, n. 04, p.370-379, abr. 2014. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1355617713001215>.

CHRISTIE, L.-a. et al. Impaired Cognitive Function and Hippocampal Neurogenesis following Cancer Chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.1954-1965, 14 fev. 2012. American Association for Cancer Research (AACR).

<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-2000>.

CUNHA, Jurema Alcides et al.. **Teste Wisconsin de Classificação de cartas: manual – adaptação e padronização brasileira**. Revisado e ampliado. São Paulo: Casa do Psicólogo, 2005.

DAVIES, Christina et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. **The Lancet**, [s.l.], v. 381, n. 9869, p.805-816, mar. 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)61963-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61963-1).

DIAMOND, Adele. Executive Functions. **Annual Review Of Psychology**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.135-168, 3 jan. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143750>.

DIETRICH, J. Chemotherapy associated central nervous system damage. In: COHEN, I.r. et al. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.i.]: Springer Nature, 2010. p. 77-85.

DUMAS, Isabelle; DIORIO, Caroline. **Polymorphisms in genes involved in the estrogen pathway and mammographic density**. 2010. BioMed Central Cancer. Disponível em: <10.1186/1471-2407-10-636>. Acesso em: 16 dez. 2018.

FALLAH, Yassi et al. **MYC-Driven Pathways in Breast Cancer Subtypes**. 2017. Biomolecules. Disponível em: <10.3390/biom7030053>. Acesso em: 10 nov. 2018.

FERLAY, J et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010. **The Lancet**, [s.l.], v. 379, n. 9824, p.1390-1391, abr. 2012. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)60595-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(12)60595-9).

GANZ, Patricia A. et al. **Cognitive Complaints After Breast Cancer Treatments: Examining the Relationship With Neuropsychological Test Performance**. Journal of the National Cancer Institute (JNCI), [s.l.], v. 105, n. 11, p.791-801, abr. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djt073>.

GANZ, Patricia A. et al. Does tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) play a role in post-chemotherapy cerebral dysfunction? **Brain, Behavior, And Immunity**, [s.l.], v. 30, n. , p.99-108, 15 mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.07.015>.

GIESE-DAVIS, Janine et al. Higher Vagal Activity as Related to Survival in Patients With Advanced Breast Cancer. **Psychosomatic Medicine**, [s.l.], v. 77, n. 4, p.346-355, maio 2015. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
<http://dx.doi.org/10.1097/psy.0000000000000167>.

GOMES-OLIVEIRA, Marcio Henrique et al. Validation of the Brazilian Portuguese Version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.389-394, dez. 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbp.2012.03.005>.

GORENSTEIN, C.; ANDRADE, L.. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.453-457, 1996.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 142, n. 2, p.231-255, maio 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>.

HAMBURGER, A.; SALMON, S.. Primary bioassay of human tumor stem cells. **Science**, [s.l.], v. 197, n. 4302, p.461-463, 29 jul. 1977. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.560061>.

HAYSLIP, John et al. **Plasma TNF- α and Soluble TNF Receptor Levels after Doxorubicin with or without Co-Administration of Mesna—A Randomized, Cross-Over Clinical Study**. 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0124988>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

HEATON, R. K. et al. **Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (WSCT)**. São Paulo: Editora Casa do Psicólogo, 2004. 346 p.

HENNEGHAN, Ashley. Modifiable factors and cognitive dysfunction in breast cancer survivors: a mixed-method systematic review. **Supportive Care In Cancer**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.481-497, 29 set. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-015-2927-y>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância., 2017. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

JANELSINS, Michelle C. et al. Longitudinal Trajectory and Characterization of Cancer-Related Cognitive Impairment in a Nationwide Cohort Study. **Journal Of Clinical Oncology**,

[s.l.], v. 36, n. 32, p.3231-3239, 10 nov. 2018. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2018.78.6624>.

JANELSINS, Michelle C. et al. Prevalence, mechanisms, and management of cancer-related cognitive impairment. **International Review Of Psychiatry**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.102-113, fev. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/09540261.2013.864260>.

JEAN-PIERRE, P.; MCDONALD, B. C.. Neuroepidemiology of cancer and treatment-related neurocognitive dysfunction in adult-onset cancer patients and survivors. **Neuroepidemiology**, [s.l.], p.297-309, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802973-2.00017-3>.

JENTZSCH, Axel M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.251-256, jan. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).

JOLY, Florence et al. Impact of Cancer and Its Treatments on Cognitive Function: Advances in Research From the Paris International Cognition and Cancer Task Force Symposium and Update Since 2012. **Journal Of Pain And Symptom Management**, [s.l.], v. 50, n. 6, p.830-841, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2015.06.019>.

JUNG, Mi Sook; CIMPRICH, Bernadine. Cognitive Deficits in Korean Women Treated With Chemotherapy for Breast Cancer. **Cancer Nursing**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.31-42, maio 2014. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ncc.0b013e3182980383>.

KANASKIE, Mary Louise; LOEB, Susan J.. The experience of cognitive change in women with breast cancer following chemotherapy. **Journal Of Cancer Survivorship**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.375-387, set. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11764-014-0387-x>.

KEEN, Judith Clancy; DAVIDSON, Nancy E.. The biology of breast carcinoma. **Cancer**, [s.l.], v. 97, n. 3, p.825-833, 23 jan. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.11126>.

KEENEY, Jeriel T.r. et al. Doxorubicin-induced elevated oxidative stress and neurochemical alterations in brain and cognitive decline: protection by MESNA and insights into

mechanisms of chemotherapy-induced cognitive impairment (“chemobrain”). **Oncotarget**, [s.l.], v. 9, n. 54, p.30324-30339, 22 jun. 2018. Impact Journals, LLC.
<http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.25718>.

KESLER, Shelli et al. Cognitive Training for Improving Executive Function in Chemotherapy-Treated Breast Cancer Survivors. **Clinical Breast Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.299-306, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2013.02.004>.

KESLER, Shelli R. Prefrontal Cortex and Executive Function Impairments in Primary Breast Cancer. **Archives Of Neurology**, [s.l.], v. 68, n. 11, p.1447-1453, 1 nov. 2011. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2011.245>.

KESLER, Shelli R.; BLAYNEY, Douglas W.. Neurotoxic Effects of Anthracycline- vs Nonanthracycline-Based Chemotherapy on Cognition in Breast Cancer Survivors. **Jama Oncology**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.185-192, 1 fev. 2016. American Medical Association (AMA).
<http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.4333>.

KOTSOPOULOS, Joanne et al. Age at first full-term birth and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 171, n. 2, p.421-426, 17 maio 2018. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-018-4822-y>.

LANGE, M.; JOLY, F. How to Identify and Manage Cognitive Dysfunction After Breast Cancer Treatment. **J Oncol Pract**. 2017 dez; 13 (12): 784-790. doi: 10.1200 / JOP.2017.026286.

LEPAGE, Chris et al. A prospective study of grey matter and cognitive function alterations in chemotherapy-treated breast cancer patients. **Springerplus**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-10, 19 ago. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-3-444>.

LI, Sha et al. Increased levels of LAPTM4B, VEGF and survivin are correlated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer patients. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 25, p.41282-41293, 18 abr. 2017. Impact Journals, LLC.
<http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.17176>.

LI, Tsung-yuan et al. Investigation of chemotherapy-induced brain structural alterations in breast cancer patients with generalized q-sampling MRI and graph theoretical analysis. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1211, dez. 2018. Springer Nature.

<http://dx.doi.org/10.1186/s12885-018-5113-z>.

LOGUE, Sheree F.; GOULD, Thomas J.. The neural and genetic basis of executive function: Attention, cognitive flexibility, and response inhibition. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [s.l.], v. 123, p.45-54, ago. 2014. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.08.007>.

MENNING, Sanne et al. Multimodal MRI and cognitive function in patients with breast cancer prior to adjuvant treatment — The role of fatigue. **Neuroimage: Clinical**, [s.l.], v. 7, p.547-554, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nicl.2015.02.005>.

MISHRA, Alok; BRAT, Daniel J.; VERMA, Mukesh. P53 Tumor Suppression Network in Cancer Epigenetics. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.597-605, 2015. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_31.

MIGUEL, Fabiano Koich. Teste Wisconsin de Classificação de Cartas. **Aval. psicol.**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 203-204, nov. 2005. Disponível em <http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04712005000200012&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 05 fev. 2019.

MOREAN, Diane F.; O'DWYER, Linda; CHERNEY, Leora R.. Therapies for Cognitive Deficits Associated With Chemotherapy for Breast Cancer: A Systematic Review of Objective Outcomes. **Archives Of Physical Medicine And Rehabilitation**, [s.l.], v. 96, n. 10, p.1880-1897, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apmr.2015.05.012>.

MU, Y.-g. et al. Working memory and the identification of facial expression in patients with left frontal glioma. **Neuro-oncology**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.81-89, 1 set. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nos215>.

NARDIN, J. M. . Toxicidades em Oncologia. 1. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2013. v. 1. 93 p

NELSON, David L; COX, Michael M.. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NETTERBERG, Ida et al. The risk of febrile neutropenia in breast cancer patients following adjuvant chemotherapy is predicted by the time course of interleukin-6 and C-reactive protein by modelling. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 84, n. 3, p.490-500, 18 jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bcp.13477>.

PALMINI, André; HAASE, Victor Geraldi. 'To do or not to do'? The neurobiology of decision-making in daily life: I. Getting the basics. **Dementia & Neuropsychologia**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.10-17, mar. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1980-57642008dn10100003>.

PARANHOS, Mariana Esteves; ARGIMON, Irani Iracema de Lima; WERLANG, Blanca Susana Guevara. Propriedades psicométricas do Inventário de Depressão de Beck-II (BDI-II) em adolescentes. **Aval. psicol.**, Porto Alegre , v. 9, n. 3, p. 383-392, dez. 2010 . Disponível em <http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04712010000300005&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 16 jun. 2019.

PESSOA, Luiz. On the relationship between emotion and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.148-158, fev. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2317>.

POMYKALA, K. L. et al. The association between pro-inflammatory cytokines, regional cerebral metabolism, and cognitive complaints following adjuvant chemotherapy for breast cancer. **Brain Imaging And Behavior**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.511-523, 9 jul. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11682-013-9243-2>.

PROVENZANO, Elena; ULANER, Gary A.; CHIN, Suet-feung. Molecular Classification of Breast Cancer. **Pet Clinics**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.325-338, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>.

QIAN, Bin-zhi; POLLARD, Jeffrey W.. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, [s.l.], v. 141, n. 1, p.39-51, abr. 2010. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>.

REN, X. et al. The triangle of death of neurons: Oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and loss of choline-containing biomolecules in brains of mice treated with doxorubicin. Advanced insights into mechanisms of chemotherapy induced cognitive impairment ("chemobrain") involving TNF- α .

Free Radic Biol Med. 2018 Dec 26;134:1-8. doi: 10.1016/j

REUTER-LORENZ, Patricia A.; CIMPRICH, Bernadine. Cognitive function and breast cancer: promise and potential insights from functional brain imaging. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 137, n. 1, p.33-43, jan. 2013. Springer Nature.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10549-012-2266-3>.

RODGERS, J. Attentional ability among survivors of leukaemia treated without cranial irradiation. **Archives Of Disease In Childhood**, [s.l.], v. 88, n. 2, p.147-150, 1 fev. 2003.

BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.88.2.147>.

ROSKOSKI, Robert. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 139, p.395-411, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.014>.

RUITER, Michiel B. de; SCHAGEN, Sanne B.. Functional MRI studies in non-CNS cancers. **Brain Imaging And Behavior**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.388-408, 11 ago. 2013. Springer Nature.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11682-013-9249-9>.

SALAS-RAMIREZ, Kaliris y et al. Doxorubicin and cyclophosphamide induce cognitive dysfunction and activate the ERK and AKT signaling pathways. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 292, p.133-141, out. 2015. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.028>.

SAYKIN, Andrew J. et al. Neuroimaging biomarkers and cognitive function in non-CNS cancer and its treatment: Current status and recommendations for future research. **Brain**

Imaging And Behavior, [s.l.], v. 7, n. 4, p.363-373, dez. 2013. Springer Nature.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11682-013-9283-7>.

SCHAGEN, S.b. et al. Monitoring and optimising cognitive function in cancer patients: Present knowledge and future directions. **European Journal of Cancer Supplements**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.29-40, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcsup.2014.03.003>.

SERRA, Katia Piton et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, [s.l.], v. 36, n. 12, p.575-580, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/so100-720320140005158>.

SHICHIRI, Mototada. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. **Journal Of Clinical Biochemistry And Nutrition**, [s.l.], v. 54, n. 3, p.151-160, 2014. The Society for Free Radical Research Japan. <http://dx.doi.org/10.3164/jcbtn.14-10>.

SILVA-FILHO, José Humberto da; PASIAN, Sonia Regina; HUMBERTO, Janaina Silva Martins. Teste Wisconsin de classificação de cartas: uma revisão sistemática de 1952 a 2009. **Psico-usf**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.107-116, abr. 2011. FapUNIFESP (SciELO).

<http://dx.doi.org/10.1590/s1413-82712011000100012>.

SONGBO, M. et al. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicol Lett**. 2019 Jun 1;307:41-48. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.02.013.

SPARANO, Joseph A. et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 373, n. 21, p.2005-2014, 19 nov. 2015. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1510764>.

STOUTEN-KEMPERMAN, Myrle M. et al. Very Late Treatment-Related Alterations in Brain Function of Breast Cancer Survivors. **Journal Of The International Neuropsychological Society**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.50-61, 22 dez. 2014. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s1355617714001015>.

SUN, Yi-sheng et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 13, n. 11, p.1387-1397, 2017. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.21635>.

TAO, L. et al. **Impairment of the executive function in breast cancer patients receiving chemotherapy treatment: a functional MRI study**. 2017. *European Journal of Cancer Care*. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/ecc.12553>>. Acesso em: 10 out. 2018.

TRENTINI, Clarissa Marcelli et al . O desenvolvimento de normas para o Teste Wisconsin de Classificação de Cartas (pesquisa em andamento). **Aval. psicol.**, Porto Alegre , v. 5, n. 2, p. 247-250, dez. 2006 . Disponível em <http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-04712006000200016&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 24 maio 2019.

TOLEDO-GUZMÁN, Mariel et al. Cancer stem cell impact on clinical oncology. **World Journal of Stem Cells**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.183-195, 26 dez. 2018. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v10.i12.183>.

VARDY, J. ROURKE S., TANNOCK I. F. Evaluation of Cognitive Function Associated With Chemotherapy: A Review of Published Studies and Recommendations for Future Research. **J Clin Oncol**. 2007; 25 (17): 2455-2463.

WANG, Yuping et al. What Factors Affect the Insomnia Symptom Trajectories in Women With Nonmetastatic Breast Cancer? **Journal of Pain And Symptom Management**, [s.l.], v. 52, n. 6, p.850-858, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2016.07.001>.

WECHSLER, David. **Escala de Inteligência Wechsler para Adultos III (WAIS)**. [s.l.]: Editora Casa do Psicólogo, 2004. 412 p. Adaptação Brasileira: Elizabeth do Nascimento.

WEFEL, Jeffrey S.; SCHAGEN, Sanne B.. Chemotherapy-Related Cognitive Dysfunction. **Current Neurology And Neuroscience Reports**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.267-275, 28 mar. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11910-012-0264-9>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer#>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

YANG, Yesol; HENDRIX, Cristina C.;. Cancer-Related Cognitive Impairment in Breast Cancer Patients: Influences of Psychological Variables. **Asia-pacific Journal of Oncology Nursing**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.296-306, 2018. Medknow.

http://dx.doi.org/10.4103/apjon.apjon_16_18.

ZHENG, Ying et al. Long-term cognitive function change among breast cancer survivors. **Breast Cancer Research And Treatment**, [s.l.], v. 146, n. 3, p.599-609, 9 jul. 2014.

Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-014-3044-1>.

ZUNINI, Rocío A. López et al. Differences in verbal memory retrieval in breast cancer chemotherapy patients compared to healthy controls: a prospective fMRI study. **Brain Imaging And Behavior**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.460-477, 15 dez. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11682-012-9213-0>.

ANEXOS

Anexo 1 - Aprovação de CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS



DADOS DA EMENDA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA COGNIÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA PARA CANCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES OXIDATIVO-INFLAMATORIOS.

Pesquisador: Andre Luis Fernandes Palmira **Area Temática:**

Versão: 6

CAAE: 81442717.8.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA **Patrocinador**

Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.396.323

Apresentação do Projeto:

O pesquisador principal Andre Luis Fernandes Palmira, responsável pelo projeto com número de CAAE 81442717.8.0000.5336 e Título: AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA COGNIÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA PARA CANCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES OXIDATIVO-INFLAMATORIOS. encaminhou ao CEP-PUCRS emenda contendo os seguintes documentos: carta de apresentação de emenda E1 e TCLE alterado.

Objetivo da Pesquisa:

O pesquisador principal Andre Luis Fernandes Palmira, responsável pelo projeto com número de CAAE 81442717.8.0000.5336 e Título: AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA COGNIÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA PARA CANCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES OXIDATIVO-INFLAMATORIOS. encaminhou ao CEP-PUCRS emenda contendo os seguintes documentos: carta de apresentação de emenda E1 e TCLE alterado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador principal Andre Luis Fernandes Palmira, responsável pelo projeto com número de CAAE 81442717.8.0000.5336 e Título: AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA COGNIÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA PARA CANCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO

COM MARCADORES OXIDATIVO-INFLAMATORIOS. encaminhou ao CEP-PUCRS emenda contendo os seguintes documentos: carta de apresentação de emenda E1 e TCLE alterado.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703 **Bairro:** Partenon

UF: RS **Município:** **Telefone:** (51)3320-3345

CEP: 90.619-900

Fax: (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PORTO ALEGRE

Página 01 de 04

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 3.396.323

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador principal Andre Luis Fernandes Palmira, responsável pelo projeto com número de CAAE 81442717.8.0000.5336 e Título: AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA COGNIÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA PARA CANCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES OXIDATIVO-INFLAMATORIOS. encaminhou ao CEP-PUCRS emenda contendo os seguintes documentos: carta de apresentação de emenda E1 e TCLE alterado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador principal Andre Luis Fernandes Palmira, responsável pelo projeto com número de CAAE 81442717.8.0000.5336 e Título: AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA COGNIÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA PARA CANCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES OXIDATIVO-INFLAMATORIOS. encaminhou ao CEP-PUCRS emenda contendo os seguintes documentos: carta de apresentação de emenda E1 e TCLE alterado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o CEP-PUCRS, de acordo com suas atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e da Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda ao projeto de pesquisa AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA COGNIÇÃO EM PACIENTES SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA PARA CANCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES OXIDATIVO- INFLAMATORIOS. proposto por Andre Luis Fernandes Palmira com número de CAAE 81442717.8.0000.5336.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1232459_E1.pdf	12/06/2019 10:37:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	alteradoTCLE.pdf	12/06/2019 10:36:39	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito
Outros	CP_TCLEpdf.pdf	12/06/2019 10:35:03	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.pdf	10/06/2019 13:33:49	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703 **Bairro:** Partenon

UF: RS **Município:** **Telefone:** (51)3320-3345

CEP: 90.619-900

Fax: (51)3320-3345 **E-mail:** cep@puers.br

PORTO ALEGRE

Página 02 de 04

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 3.396.323

Ausência	TCLE.pdf	10/06/2019 13:33:49	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito
Outros	cartaassinada.pdf	14/05/2018 16:47:44	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito
Outros	cartapendenciaareatemática.docx	14/05/2018 16:47:02	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito
Outros	CPword.doc	24/04/2018 22:55:52	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito
Outros	CartaPend.pdf	17/04/2018 18:48:44	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	17/04/2018 18:44:15	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito
Outros	DocCEP.pdf	17/01/2018 17:01:53	Andre Luis Fernandes Palmi	Aceito

Cronograma	cronograma.pdf	11/01/2018 15:34:00	Andre Luis Fernandes Palmini	Aceito
Outros	DocumentoUnificado.pdf	20/12/2017 10:35:06	Andre Luis Fernandes Palmini	Aceito
Outros	Lattes.pdf	20/12/2017 10:33:57	Andre Luis Fernandes Palmini	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	20/12/2017 10:33:26	Andre Luis Fernandes Palmini	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	06/12/2017 09:22:19	Andre Luis Fernandes Palmini	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaUnimed.pdf	06/12/2017 09:19:56	Andre Luis Fernandes Palmini	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaUFSM.pdf	06/12/2017 09:19:41	Andre Luis Fernandes Palmini	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaCEViver.pdf	06/12/2017 09:19:23	Andre Luis Fernandes Palmini	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	06/12/2017 09:15:02	Andre Luis Fernandes Palmini	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703 **Bairro:** Partenon**UF:** RS **Município:** **Telefone:** (51)3320-3345**CEP:** 90.619-900**Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@puhrs.br

PORTO ALEGRE

Página 03 de 04

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO
SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 3.396.323

PORTO ALEGRE, 17 de Junho de 2019

Assinado por:

Paulo Vinicius Sporleder de Souza (Coordenador(a))

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703 **Bairro:** Partenon

UF: RS **Município:** **Telefone:** (51)3320-3345

CEP: 90.619-900

Fax: (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PORTO ALEGRE

Página 04 de 04

Anexo 2 - Aprovação da submissão

De: eesserver@eesmail.elsevier.com <eesserver@eesmail.elsevier.com> em nome de Brain Research <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Enviado: segunda-feira, 24 de junho de 2019 11:10

Para: ibmcruz@hotmail.com; ivanadacruz@gmail.com

Assunto: Your PDF Has Been Built

*** Automated mail sent by the system ***

Brain Research

Title: OXIDATIVE MARKERS INDUCED BY FIRST EXPOSURE TO CHEMOTHERAPY DRUG INCREASE RISK OF EARLY EXECUTIVE DEFICIT OF BREAST CANCER WOMEN

Authors: Caren F Nascimento, Psychologist, MSc, PhD; Verônica F Azzolin, MSc, PhD; Natália N Fontoura, Undergraduate Student; Licério V Padoin, MD, PhD; Danieli P Monteiro, Undergraduate Student; Beatriz Sadigursky, Undergraduate Student; Ivo Emilio C Jung, Psychologist, MSc, PhD; Ivana Mânica Cruz, MSc, PhD; Julia S Padoin, Physician, MD; André F Palmini, MD, PhD

Dear ibmcruz,

The PDF for your submission, "OXIDATIVE MARKERS INDUCED BY FIRST EXPOSURE TO CHEMOTHERAPY DRUG INCREASE RISK OF EARLY EXECUTIVE DEFICIT OF BREAST CANCER WOMEN" has now been built and is ready for your approval. Please view the submission before approving it, to be certain that it is free of any errors. If you have already approved the PDF of your submission, this e-mail can be ignored.

To approve the PDF please login to the Elsevier Editorial System as an Author:

<https://nam04.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fees.elsevier.com%2Fbres%2F&data=02%7C01%7C%7Cad89a7e7b1cc484ce15d08d6f894a127%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C636969714568305923&data=34umWNsVv78tL1aMnbnWYM%2FHVBCB11E3ygGRZR4mlss%3D&reserved=0>

Your username is: ibmcruz@hotmail.com

Then click on the folder 'Submissions Waiting for Author's Approval' to view and approve the PDF of your submission. You may need to click on 'Action Links' to expand your Action Links menu.

You will also need to confirm that you have read and agree with the Elsevier Ethics in Publishing statement before the submission process can be completed. Once all of the above steps are done, you will receive an e-mail confirming receipt of your submission from the Editorial Office. For further information or if you have trouble completing these steps please go

to: https://nam04.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fhelp.elsevier.com%2Fapp%2Fanswers%2Fdetail%2Fa_id%2F88%2Fp%2F7923&data=02%7C01%7C%7Cad89a7e7b1cc484ce15d08d6f894a127%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C636969714568315946&data=Jdqwep0019jA6iL09g12PGI01j3gCPrCCCoL0h%2B8NYo%3D&reserved=0.

Please note that you are required to ensure everything appears appropriately in PDF and no

Anexo 3 – Artigo

OXIDATIVE MARKERS INDUCED BY FIRST EXPOSURE TO CHEMOTHERAPY DRUG INCREASE RISK OF EARLY EXECUTIVE DEFICIT OF BREAST CANCER WOMEN

Caren Ferreira do Nascimento^{1,2}, Verônica Farina Azzolin^{3,4}, Nathália Nascimento Fontoura⁴, Licerio Vicente Padoin¹, Danielle Pillar Monteiro⁴, Beatriz Sadigursky⁴, Ivo Emílio da Cruz Jung⁴, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{3,4}, André Luis Fernandes Palmimi¹

1 Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

2 Clínica de Hematologia e Oncologia Viver, Santa Maria

3 Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Universidade Federal de Santa Maria

4 Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

Corresponding author: Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil. Zipcode: 97.105-900. Phone: 55-55-991199099; email: ibmcruz@hotmail.com

Abstract

Breast cancer (BC) chemotherapy can produce adverse effects including executive deficits (ED). However, main causes of this adverse effect were not completely understood. We postulated that high responsiveness to first chemotherapeutic drug exposure could trigger cytotoxic and oxidative stress and subsequent ED states. This hypothesis was tested in BC-women that donated blood samples before and immediately after the first chemo drug administration. Peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) were obtained from these blood samples and 24 h cultured in standardized conditions. Cellular viability, oxidative markers and gene expression cytokines were quantified. BC-volunteers in the 2^o and 4^o chemo cycles were tested by ED using Wisconsin Card Sorting test (WCST). Thirty women completed the study and 78% (n= 21) presented some ED indicator observed in the 2^o and/or 4^o cycles. ED-women showed decrease in PBMC viability. Lipoperoxidation (LP) levels were also higher in ED- than WED-women. ROC curve analysis showed that LP could be a

predictive variable of ED development (area on the curve = 0.744). Women with high LP concentrations (0.1 nmol MDA/mL supernatant) presented risk to develop ED 3.43 times greater (95%CI:1.22-9.68). This association was independent of age, chemotherapy treatments, anxiety and depression. The results suggested that it could be possible to identify women with risk to ED development by comparison of oxidative markers before and after first chemo drug exposure.

Key-words: oxidative stress, chemotherapy, cognitive decline,

1. Introduction

Breast cancer (BC) is a disease with a major impact on the epidemiological profile of the global population, reaching 2.1 million women each year, triggering highest number of deaths (WHO, 2018). Most BC-therapies involve chemotherapy, which can produce cytotoxic states in the body, responsible for the adverse effects including cognitive impairments (CI), such as executive deficits (Wefel et al., 2015). In the past two decades, neuropsychological studies have accumulated evidence that CI could be attributed to neurotoxic effects of chemotherapy inducing oxidative stress and transient inflammatory states (Kesler et al., 2013; Ganz et al., 2013; Janelins et al., 2014; Cheung et al., 2015, Morean et al., 2015; Hayslip et al, 2015; Yang and Hendrix, 2018; Williams et al., 2018).

In fact, inflammation state is closely related to oxidative stress triggered by exposure to the chemotherapeutic agent. In this case, women more sensitive to the drug could produce high levels of oxidative markers triggering molecules damages such as DNA damage, membrane lipoperoxidation (LP) and protein carbonylation (PC). Combination of oxidative stress plus high inflammatory response could induce induce brain-blood barrier (BBB) permeability to chemo-drugs, which would be a key element for the occurrence of brain lesions (Ren et al., 2018; Songbo et al., 2019) (Figure 1).

Figure 1 here

Considering this hypothesis, it would be expected that women exposed for the first time to the chemotherapeutic could show a greater intensity of previous production of oxidative molecules that could increase the risk of early executive deficit observed during chemotherapy period. To test this hypothesis, a prospective study was performed analysing the risk of executive deficit development by oxidative and cytotoxic response of blood and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of women exposed to the first time to chemotherapeutic drug.

2. Methods

2.1 Study design

This prospective study, conducted between 2017-2019, included patients referred for chemotherapy treatment for breast cancer, at the Clínica de Hematologia e Oncologia Viver, in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The convenience sample consisted of 40 volunteers who initiated the chemotherapy protocol within 20 days after the surgical procedure (adjuvant treatment) or, after diagnosis, without prior surgery (neoadjuvant treatment).

The study started from January 2017 and ended in June 2019. The study was approved by ethical board of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) under the registration in the Brazil Platform of the Certificate of Presentation for Ethical Appreciation (CAAE) - 81442717.8.0000.5336. All participants provided written informed consent.

This investigation included women with a primary BC diagnosis (with or without metastasis); age \geq 21 years and with indication of chemotherapy regimen according with the Brazilian National Comprehensive Cancer Network (NCCN®) guidelines. Women with physical weakness and / or psychic alterations; BC-recurrence;

neurodegenerative and psychiatric disorders and other chronic degenerative diseases that could affect results were excluded of the study. Until moment of inclusion, all volunteers did not refer any cognitive decline complains.

General prospective study design is presented in the Figure 2. Candidate volunteers were previously selected by clinical form schedule for patients that would start chemotherapy (seven days before first chemo administration). In the zero day, patients were invited to participate of research some minutes before they are undergoing the first chemo drug administration. Volunteers that accepted to participate of the response signed informed consent and a first blood sample was collected as further described. A semi-structured sociodemographic and clinical interview, consisting of two parts (identification and clinical history) was applied whereas women received these first chemo drug administration, which occur for approximately four hours. Considering that in the first chemo drug administration women present anxious behaviour psychometric tests were not applied in this early moment. Immediately after chemo drug application was collected the second blood sample.

The two blood samples were immediately transferred by Biogenomic Lab from Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) in standardized conditions. Two general protocols were performed with these blood samples: (1) analysis of plasma oxidative markers; (2) 24 h cell cultures of PBMCs collected in standardized conditions, with subsequent oxidative markers and cellular viability analysis. When women returned to second and four chemo cycles, psychometric tests were applied by a psychologist professional.

Clinical and laboratorial data were finally jointed in one databank to perform analysis of possible association between *in vitro* oxidative and cytotoxic chemo drug and risk of earlier executive deficits evaluated in the 2^o and 4^o chemo cycles.

Figure 2 here

2.2 Psychometric tests

Executive function was evaluated using Wisconsin card sorting test (WCST), which is an instrument for neuropsychological evaluation of the individual's ability to reason abstractly and modify their cognitive strategies in response to changes in environmental contingencies (Trentini et al., 2006). WCST is considered a classical task used to assess frontal lobe function (Gläscher et al., 2019). Moreover, this test has been applied in previous studies involving cancer patients in order to evaluate neurocognitive function (Li et al., 2014; Eren et al., 2015; Yang et al., 2017; Chou et al., 2019). WCST test was applied in a similar way as described by Li et al (2014). Briefly, the volunteer was told to sort 128 cards with designs of geometrical figures that differed according to the categories color, shape or number, but she/he was not told that the rules for sorting differ according to the categories color, shape or number. It is important to point out that the rule for sorting varied periodically. The volunteer had to derive the sorting rule from the feedback following every sorting. After 10 correct responses, a set was considered to be installed and the sorting rule was changed.

For the analysis of the data, we used the Z score for the number of completed categories and perseverative errors, aiming at the interpretation of the patient's performance in relation to neurologically intact individuals. For diagnostic purposes, interpretation is recommended from the normatively corrected scores demographically, providing the performance of the evaluated in relation to their age (Cunha et al., 2005). As there are no normative scores for population over 17 years and 11 months validated in Brazil, the cut-off points of the American sample were adopted. According to the methodology of the American authors, the instrument can be reapplied after a month of interval, without loss of the psychometric properties (Cunha, 2005; Miguel, 2005).

Just patients who completed all the assessment steps were included in the statistical analysis.

A reliable change index (RCI) was used for individual cognitive changes, in order to assess the actual individual variation of the re-evaluation, a statistical test that best verifies the reliable change after an intervention, removing artefacts and measurement errors, such as the effects of practice and learning. For this, the variables were standardized according to the normative data of a control population and converted into z-score. In general, the individual variation was subtracted from the average variation of the group and this result divided by the standard error of the difference between the two measures. We assumed a 90% confidence interval and RCI indices $> 1,645$ considered reliable improvement, $-1,645 > \text{RCI} < 1,645$ cognitive stability and $\text{IOR} < -1,645$ reliably worsened in the assessed function.

For assessment of executive function, the WCST we used the following two items in the current survey: the total number of completed categories (CC), percentage of errors in perseveration (ER). Subjects' performance was compared with normal population and transformed into percentile ranks. Those performances in the less than five percentile rank were considered to be atypical.

In this study all patients who had an atypical performance observed in one of two categories (CC and EP) in the 2nd or 4th cycle of chemotherapy, at which time WCST was applied were considered to have some level of executive deficit (ED). Therefore, it was possible to categorize the sample into two general groups: patients without an executive deficit (WEC) and patients with an executive deficit (EC).

Work memory and processing speed indicators were also evaluated in the volunteer's participant of this study using two subtests of the Wechsler Intelligence Scale for Adults III (WAIS): inverse digit evaluation and processing of new information.

The application of this tool was conducted according to DIAMOND (2013) and the details of the application of these two sub tests are given below: in both tasks, the researcher read aloud, a sequence of numbers for the research volunteer. For each Direct order item, the volunteer had to repeat the numerical sequence in the same order presented. For each item of the Inverse order, the volunteer had to repeat the numerical sequence in the opposite order to that presented by the researcher. The application time was approximately 5 minutes. Digits in the direct order evaluated the retention capacity of immediate memory and the digits in the reverse order measured the working memory and the capacity for reversibility. Low scores in digits, mostly in reverse order, usually appear in people who are unable to pay attention to solving more complex mental tasks. Data from the subtest's digits were analysed by the weighted score, with the mean of ($M = 10$) and standard deviation ($SD \pm 3$) as instructed in the manual for administration and evaluation, previously validated in Brazil by Nascimento et al (xx) from Wechsler (2004).

The search symbols subtest evaluates fluid ability, processing speed, perceptual organization, mental operating speed, psychomotor speed, attention, concentration, short-term visual memory, visual-motor coordination, and cognitive flexibility being an adequate measure for the inference of the global cognitive ability (Wechsler, 2004). For each item of this subtest, the volunteer visually analysed two groups of symbols: a model group (composed of two symbols) and a search group (composed of five symbols) indicating whether one of the symbols of the model group was also part of the search group. Soon after, the volunteer responded to as many items (lines) as possible, within a time limit of 120 seconds. Data from the subtests search symbols were analysed by the weighted score, with the mean of ($M = 10$) and standard deviation ($SD \pm 3$), as previously validated in Brazil by Nascimento et al (xxx).

Depression and anxiety states were also determined using Beck Depression Inventory II (BDI-II) and Beck Anxiety Inventory (BAI), respectively. These tools were screened in the 2nd and 4th cycles of chemotherapy, with a retest interval of 42 days. BDI-II test is composed of 21 items, whose objective is to estimate the overall severity of depression in people from 10 years old to old age. In addition to reflecting affective and cognitive symptoms, it also reflects somatic and vegetative symptoms of depression (Beck et al., 2011). The application time was approximately 15 minutes.

The intensity of anxiety symptoms measure by BAI test is perform through analysis of 21 items that are scored each one. The patients responded to the 21 items according to the presence or absence of symptoms / signs for anxiety that should be marked as: absolutely not; slightly (did not bother me much); moderately (it was very unpleasant, but I could bear it) or seriously (I could hardly bear it). The application time was approximately 10 minutes. The sum of items allows the following classification: minimal anxiety (zero-10); mild (11 to 19); moderate (20 to 30) and severe (31 to 63). The BAI was also applied in the 2nd and 4th cycles of chemotherapy, with a retest interval of 42 days.

2.3 Assay of cytotoxic and oxidative PBMC response to first chemotherapeutics exposure

This study developed an assay that blended traditional analyses of blood oxidative markers with analyses performed from the *in vitro* PBMCs 24 h cultures, with PBMCs samples obtained from women before and shortly after the application of the first dose of chemotherapy. The analysis was based on the idea that the chemotherapeutic is injected through the blood and the PBMCs come in contact with this drug. Because PBMCs are not the preferred target cells of the chemotherapies, drug contact with

these cells is expected to elicit some level of oxidative stress or transient inflammatory response. Therefore, would be possible to consider that women with a more intense oxidative response to chemotherapy could be more susceptible to neurotoxic events including ED development.

In this protocol, blood samples were collected before and after the intravenous chemo drug administration and PBMCs obtained were cultured for 24 hours under standardized conditions. Further, both samples (cells and the supernatant medium) were used to quantify cytotoxic and oxidative markers. For the sake of limiting the amount of blood sample, and complexity in laboratory tests, many of which needed to be done on the same day, we opted to evaluate in 24 hours only the oxidative markers and not classic markers of inflammation as is the case of the inflammatory cytokines. However, it was possible to evaluate the occurrence of the modulation of the gene expression of inflammatory cytokines.

The assay was based on in vitro previous pharmacological protocols using cultures of PBMCs or cancer cell lines previously described by Barbisan et al (2014) and Azzolin et al (2016). The collection of blood was performed by the nursing team, the same one that applies the chemotherapy treatment in the patients. For this, they collected blood samples via a supraclavicular implanted catheter or via venous puncture. Two 10 ml whole blood samples were taken before chemo-treatment (control blood, C) and immediately after chemo-treatment (Chemo-blood, Che). Both collections were made in vacutainer tubes containing ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA), as anticoagulant.

The blood samples were kept under refrigeration (-20C°) within a maximum of 2 hours. The plasma was first separated from the red cells and leukocytes by centrifugation (3000 rpm) for 15 minutes. Oxidative markers were initially evaluated in

the plasma obtained from the C and Che blood samples to verify if there were alterations in these markers prior to the administration of the chemotherapeutic agent in women who developed ED or if any immediate oxidative change could occur immediately after the application of the drug.

From total blood samples, PBMCs were obtained by density gradient centrifugation using Histopaque® (Sigma-Aldrich-10771) and evenly distributed in 6-well plates containing culture medium (RPMI) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic and antifungal. The plates were maintained at 37 ° C with 5% CO₂ for 24 hours. PBMCs viability was assessed by analysis of mitochondrial activity analysis through the 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay similar to described in Azzolin et al (2016). Colorimetric quantification was performed on a SpectraMax® M2 / M2 reader (Molecular Devices Corporation) and absorbance was measured at 570 nm.

Quantification of double stranded DNA (dsDNA) fragments in the culture medium identified by dyes with high affinity for DNA has also been used to determine cytotoxicity. The dsDNA quantification was performed using Quant-iT™ dye PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, Life Technologies) that is a stable and fluorescent reagent that has high affinity for ds-DNA using approach similar to described by Ahn et al. (1996) with slight modifications. Briefly, sample from cell culture supernatant (10 µL) was transferred by 96-well plate (in triplicate) and dissolved in 80 µL phosphate buffer with 10 µl of Picogreen® DNA solution. The reaction remained in the dark for five minutes at room temperature, and subsequently the fluorescence was reading at 480nm excitation and 520 nm emission. The high levels of fluorescence indicate high cell death (Azzolin et al. 2017).

2.3 Oxidative markers assays

ROS levels were quantified by dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay according to Halliwell and Whiteman (2004). Nitric oxide (NO) was assessed by analysing the nitrate levels using the Griess reagent (Allo, 2012). Oxidative stress can cause extensive damages on cellular membranes by lipo peroxidation (LIP). Therefore, LIP levels were determined through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) spectrophotometric assay following instructions previously described by Jentzsch et al (1996). In this assay, reaction between malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid was quantified by spectrophotometry at 535 nm. Oxidative stress can induce important protein damage leading a state known as protein carbonylation where occur chain fragmentation and amino acids are released, with the frequent production of carbonyl compounds. Carbonyl groups can be detected based on the reaction with dinitrophenylhydrazine, as previously described by Barbisan et al (2014). The absorbance was read at 370 nm.

2.4 Cytokines gene expression assay

A complementary analysis of the gene expression of cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10 was conducted. The beta-actin gene was used like housekeeping. The evaluation of the gene expression was performed from the extraction of the mRNA of the samples with trizol, then the mRNA will be converted into cDNA using the reverse transcriptase, and finally the cDNA is used for the real-time polymerase chain reaction (qRT- PCR), according to which the initiation primers used are described in Table 1.

Table 1 here

2.5 Statistics

The results were initially plotted in an Excel spreadsheet and further analysed using the statistical software SPSS (Version 22.0). The sample size was estimated at least

24 subjects to provide a power of 80% to detect a difference in oxidative markers, with a two-sided α -level of 0.05, allowing for an attrition rate of 20%. All demographic and clinical variables were initially described as relative frequency (%) or mean \pm standard deviation (SD). Kolmorov-Smirnof test was used to ascertain whether psychometric and laboratorial quantitative variables had normal distribution. As most of the variables had no normal distribution, all other statistical comparisons were made with non-parametric tests. Comparison between women grouped in the two WED and ED categories were performed verifying association between this grouping with age, educational level, mood indicators (anxiety and depression), other cognitive alterations observed by the WAIS test, oxidative markers and cytotoxicity. The qualitative variables were compared by chi-square test or Fisher's exact test, while comparison of the quantitative variables was conducted by a Wilcoxon-Mann-Whitney independent comparison test. In these comparisons, as data did not have a normal distribution, the results were presented as relative frequency (%) or by the median description. Finally, logistic regression analysis (Backward Wald) was conducted to investigate whether the association between oxidative and cytotoxic variables and development of executive deficit was influenced by age, education level and therapeutic regimen of the patients. The accuracy of predictions was tested by an area under the receiver operating characteristics (ROC) analysis. ROC curves were obtained by plotting the true-positive rates (sensitivity) against the false-positive rates (1-specificity). Areas under the curve (AUCs) with 95% CIs were calculated for sensitivity and specificity values. All associations with $p > 0.05$ were considered significant.

3. Results

Initially the study included 40 women, however only 30 (75%) completed all phases of the study and were considered in the analysis of the results. The mean age of the women included in the study was 53.5 ± 10.1 years (minimum of 34 and maximum of 72 years). The other basal characteristics are presented in Table 2. As can be observed, most of the volunteers included in the study were married, had a low educational level (corresponding to complete primary education in Brazil), were already in menopause and reported daily medication use.

Regarding the type of cancer, a higher prevalence of women with the Luminal A type occurred. As the women included in the study had different staging levels and therapeutic regimens used, these regimens were categorized into two groups: those that included the use of anthracyclines and those that do not include the use of this chemo-drug. In this case, most of the women investigated did not present anthracycline use in their therapeutic regimen.

Table 2 here

The Table 3 presents the general mean scores in relation to the executive function test considering the following categories: categories achieved (CA) and perseverative errors (PE). The comparison between these results in women in the 2nd and 4th cycles of chemotherapy showed significant differences. In the case, the results pointed to an improvement in the scores found in the 4th cycle in relation to the 2nd.

Table 3 here

A significant decrease in women with an executive deficit assessed by the CA category was observed in the 4th Cycle compared to the results obtained in the 2nd Cycle. On the other hand, the frequency of women with executive deficit assessed by

the PE category did not present significant differences between the results obtained in the 2nd and 4th cycles (Figure 1A).

From these results, the frequency of WED in the tests conducted in both cycles was evaluated, and women who presented an executive deficit in both evaluations, and those who presented deficits only in the 2nd cycle or only in the 4th cycle. As can be seen in Figure 1, only 30.0% of the women did not present executive deficit in the CA category in both cycles, while in the PE category the absence of deficit in both cycles was observed in 36.7% of the women.

These results allowed us to identify that only a very limited number of women (Figure 3C) who did not have any type of executive deficit in any of the two categories evaluated here (CA and PE) and in the two cycles in which the instrument was applied.

The analysis of work memory indicators and processing speed made through the application of WAIS subtests to search for symbols and digits did not show significant differences between the two cycles and presented mean values similar to the general population. For this reason, these two indicators were not included in the identification of women with executive deficit who were previously performed using the WSCT test.

As there was variation in executive dysfunction among women, we chose to compare the potential influence of sociodemographic, psychometric and oxy-inflammatory variables between the two groups composed of women WED and WE, is identified in at least one of the chemotherapy cycles, or in at least one of the categories of the WCST test.

Figure 3 here

The comparison between these two groups did not show significant influence with age even though the p value remained within the limit of significance ($p = 0.77$).

Level of schooling, marital status, menopausal status, prior history of surgery was also not significantly associated between these two groups of women. The anxiety and depression evaluated in the 2nd and 4th cycles also did not present significant influence among women belonging to the WED and ED groups.

Considering these two categories, it was evaluated whether plasmatic indicators of toxic-inflammatory response related to the application of the chemotherapeutic could be associated with the independent of the cycle or the WCST test category evaluated here and results are summarized in Table 4.

The only blood marker before the use of chemotherapy, which showed significant differences between the two groups, was NO levels. However, contrary to what would be expected under normal conditions, in which inflammatory agents occurred induction and increase of NO levels, the group of ED presented lower levels of this marker in relation to the WDE group. The other oxidative markers were similar between group indicating no relevant differences in concentration of these molecules before chemo drugs administration

In this analysis the markers were measured before the women started the 1st cycle of chemotherapy and immediately after (~4 hours) the end of the first dose of chemotherapy. Since the chemotherapeutic action on the markers could be observed within the next 24 hours, cultures of PBMCs from women's blood before and after receiving the chemotherapeutic were also analysed.

Both protocols that evaluated PBMC cytotoxicity showed significant differences between WED and ED women. The presence of the chemotherapeutic, women of the ED group also presented higher LIP levels WED women. In the dsDNA protocol Che-PBMC mortality increased 57% in ED than WED women and in MTT assay, cellular viability decreased to 62% in E than WED women.

LP levels were also present significant differences between two groups. In this case, ED presented higher LP levels than WED women. ROC curve analysis showed that this variable could be predictive of ED development (Figure 4). In the case, LP levels were those that presented predictive value [area on the curve (AUC) = 0.744]. In PBMC cultures obtained after first exposure to chemotherapy, a concentration of 0.10 nmol MDA/mL cell culture supernatant has sensitivity of 0.82 and specificity of 0.63% of detection of patients with potential to DE-development. Women with high LP concentrations measured in cultures of PBMCs obtained after 4 hours of the first cycle of chemotherapy had a relative risk (RR) to develop an early executive deficit of 3.43 times greater (95% confidence interval of 1.22 -9.68) than women with LP concentrations lower than 0.1 nmol MDA/mL cell culture supernatant.

Figure 4 here

Multivariate analysis showed that association between LP > 0.1 nmol MDA/mL PBMC culture supernatant was associated with DE development independent of age, chemo treatment, anxiety and depression states ($p = 0.031$).

Finally, a comparison between WDE and DE groups in respect to cytokine gene expression of PBMCs 24 h cell cultures was performed, and data are summarized in the Figure 5.

Figure 5 here

When the gene expression of cytokines from cells collected before and after chemotherapy was compared, the vast majority of the women presented IL-1B overexpression (60.0%, $n = 18$), overexpression of the IL-6 gene (76.7%, $n = 23$), overexpression of the TNF α gene (76.7%, $n = 23$). Overexpression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 gene (40.0%, $n = 12$) was also observed, although this effect was observed in a smaller number of women.

Based on these results a comparison was made of the frequency of overexpression of inflammatory cytokines among the WED and ED women. However, no significant differences were observed between them.

4. DISCUSSION

The present study sought to identify the potential influence of oxidative stress markers modulated by the first exposure of the blood to chemotherapy in the development of early indicators of executive deficit in women with breast cancer. The overall set of results showed some changes in the levels of oxidative markers, especially of the LP suggesting that the toxicity caused by the immediate exposure to the chemotherapeutic could be an indicator of the risk of developing short-term executive deficit (even in the period of chemotherapy). The main results obtained here and their potential clinical relevance will be discussed in greater detail below.

Initially, it should be pointed out that, during the conduct of this longitudinal study, the high prevalence of executive deficit indicators (73.3%) in women with breast cancer undergoing chemotherapy was confirmed. This is because, according to Hendrix (2018), up to 75% of these women suffer from disease-related cognitive impairment, including side effects induced by chemotherapeutic treatment. Breast cancer patients receive different treatments based on tumor size, and these treatments usually result in physical or cognitive deficits in patients. In this context, other authors propose that a range of 15 to 50% of patients with malignant tumors will present persistent cognitive impairment after chemotherapy (VARDY et al., 2007). Further studies, such as that performed by Li et al (2018), have confirmed the occurrence of brain structural changes induced by chemotherapy via generalized magnetic resonance imaging. This research also described the association between changes in

structural brain networks and neuropsychological deficits in women who survived breast cancer.

In fact, cognitive disorders, including language skills, memory, attention, speed of information processing, and executive function can be seen in cancer patients, especially when the disease is in an advanced state. The main causes of cognitive impairment in cancer patients are still unclear and may be associated with mood disorders, especially depression or even chemotherapy drugs (DAVIS et al., 2013; LI et al., 2014; KESSLER et al. al., 2014).

In relation to the effect of chemotherapy this could occur via changes in oxidative and inflammatory metabolism. Much attention has been paid to the inflammatory role in the onset of executive deficit induced by chemotherapy. For example, a longitudinal study, conducted by Alfano et al. (2017), evaluated 209 women with breast cancer and 106 healthy (control), in whom some pro-inflammatory factors such as IL-1, IL-6 and TNF α were quantified. This assessment was conducted 6 and 18 months after cancer treatment. The baseline values of these markers were similar between the patients and the control group. However, in survivors who underwent surgery, radiotherapy and chemotherapy, there was a significant increase in the levels of pro-inflammatory cytokines (ALFANO et al., 2017; CHEUNG et al., 2015).

Previous research has suggested that altered inflammatory patterns could be associated with cognitive dysfunction present in women with breast cancer and chemotherapy. For example, Hayslip et al. (2015) described the occurrence of increased TNF- α levels after chemotherapy related to cognitive complaints in breast cancer survivors, possibly due to oxidation of plasma proteins. Thus, it appears that increased levels of proinflammatory cytokines play an intermediate role in cognitive dysfunction after chemotherapy. In a large cohort study in Singapore with 99 subjects,

high concentrations of IL-6 and IL-1 β were found in patients with worse performance of processing speed and other cognitive alterations (CHEUNG et al., 2015).

In a study that examined the relationships between adjuvant chemotherapy and proinflammatory cytokines, regional cerebral metabolism and cognitive complaints in patients with early-stage breast cancer, 33 patients were included who completed the initial treatment using FDG-PET markers of pro-inflammatory drugs (IL-1ra, sTNF-RII, CRP and IL-6) and assessment of cognitive complaints at the start of treatment and one year later. Metabolism in the medial prefrontal cortex and anterior temporal cortex correlated with both memory complaints and cytokine levels (POMYKALA et al., 2013).

The relationships between cytokine levels (IL-6, IL-8 and MCP-1) and type of chemotherapy were also evaluated before the 2nd cycle and after two consecutive cycles of chemotherapy (cycle 4) in 54 breast cancer patients in the initial stage, who received AC / FAC or CMF. Levels of IL-6, IL-8 and MCP-1 increased in the AC / FAC group and decreased in the CMF group. The only significant change between the groups was IL-6 ($p < 0.05$). These preliminary results suggest that AC / FAC would induce increased levels of cytokines than in CMF. Patients receiving doxorubicin-based chemotherapy (with cyclophosphamide-AC, or cyclophosphamide plus fluorouracil-FAC) or cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF) may have different modes of action, affecting cytokine levels differently (JANELSINS et al. 2012). Therefore, it is believed that states of chronic inflammation associated with chemotherapy could contribute to the evolution of side effects such as cognitive decline in women with breast cancer.

Despite the relevance of inflammation in the consolidation of cognitive decline in women with breast cancer undergoing chemotherapy, one of the first events triggered by these drugs concerns the establishment of oxidative stress and

cytotoxicity in healthy cells, especially leukocytes, cardiomyocytes or even SNC. According to the review by REN et al (2019) on the subject, 50% of anticancer drugs approved by the United States Food Drug Administration (FDA) are agents that generate ROS and can compromise the blood-brain barrier via several metabolic routes including stress oxidative.

It is usually oxidative stress, DNA damage and cell death induction (or apoptosis or necrosis) that are events that precede the induction of the inflammatory response (REN et al., 2019). This type of side effect has been consistently described in relation to the use of anthracyclines such as doxorubicin. Anthracyclines have been a mainstay of breast cancer therapy for decades. However, concerns regarding long-term toxicities have raised interest in alternative adjuvant therapy options with more favorable toxicity profiles. For example, doxorubicin is capable of inducing cardiotoxicity states through oxidative stress that increases LP rates, DNA damage, calcium homeostasis disorders, among others (for review see SONGBO et al., 2019).

As chemotherapeutic agents are inducers of oxidative stress, being relevant parts in the establishment of inflammatory states that predisposes to changes in the CNS (REN et al., 2019), the study here focused its analyzes on the potential role of the sensitivity of women to modulation of markers of the oxidative stress at the first exposure to chemotherapy. Review of the literature has not identified, to date a study with this focus. To do so, the research carried out a protocol that combined not only blood collection and analysis of oxidative markers present in it, but also culture of PBMCs from samples of blood collected before the application and 4 hours after the application of the first dose of chemotherapy. This strategy made it possible to compare the previous oxidative profile and soon after the chemotherapy.

Although the association was observed in several cytotoxic and oxidative variables, elevated LP levels were those that presented a regular power of prediction of risk to the development of the executive deficit. According to Shichiri's (2014) review of the subject, the brain is extremely sensitive to oxidative damage for several reasons. On the one hand, the brain consumes a concentration of oxygen (about 20%) to produce energy. In addition, several areas of the brain, including the substantia nigra, caudate nucleus, putamen and globus pallidus, are rich in iron. It is generally accepted that iron accumulates in the brains of older individuals, and iron ions that are released after brain damage can catalyze free radical reactions. Thus, the brain per se is a source of reactive oxygen species (ROS). The generation of hydrogen peroxide dependent on the I complex in the cerebral mitochondria is greater than in the mitochondria of the skeletal muscle. Finally, neuronal membranes are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), particularly arachidonic acid (AA), docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). These PUFAs are particularly vulnerable to oxidative stress due to the possession of unsaturated double bonds. For these reasons, neural cells are more susceptible to oxidative damage when compared to other body tissues (review in SHISHIRI, 2014).

In this context, it is plausible to suppose that women with elevated levels of LP already on exposure to the first dose of chemotherapy could be at greater risk of developing executive deficit even in the period of chemotherapy. However, the impact on the intensity and maintenance of these deficits linked to greater oxidative responsiveness to chemotherapy is an open question.

Considering that occur an over expression of inflammatory cytokines genes, it is also possible that this greater oxidative responsiveness may influence the

establishment of neuroinflammatory frames inducing the executive deficit. Again, this is another open question to be answered from future complementary studies.

Finally, it is relevant to comment on the methodological limitations of this work. Within these, the main one surely concerns the low sample size of the study. This condition prevented a robust analysis of potential intervening factors in the association between oxidative markers and the development of the executive deficit. However, since a differentiated protocol in which classic analyses of blood markers were mixed with cell culture was conducted, this limitation is believed to be attenuated.

Another limitation concerns the time of follow-up of women in relation to the occurrence of executive decline (only evaluated in the 2nd and 4th cycle). Again, this limitation was associated with limited time for the development of the study, from which results could only be analyzed after all psychometric, cell culture and biochemical-molecular protocols were performed. Thus, it can be considered as a first exploratory study that would use as a methodological strategy analysis of the cytotoxic and oxidative response of PBMCs before and after the 1st dose of the chemotherapeutic. Here it is important to comment that other markers could have been evaluated, including DNA damage analysis, physiological stress markers such as cortisol, ACTH and DHEA and also inflammatory cytokines. However, the amount of biological sample for carrying out these tests and financial restrictions related to performing immunoassays limited the study to the analysis of markers described herein. Despite these limitations, it is true that inflammatory responses including elevation in cytokine levels would be easier to assess in 72-hour PBMC cultures. However, this procedure would increase the chance of loss of biological samples and variation in the responses obtained. For this reason, the identification of risk markers, more general and immediate as is the case of LP are much more relevant.

In this context, the results presented here provide perspectives for complementary analyses that confirm the potential association between oxidative markers and the development of executive deficit. It should be noted that the techniques used are easy to apply and inexpensive (because they are 24hour cell cultures) and could be easily implanted in clinical analysis laboratories.

Funding sources

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FAPERGS) – Finance Code Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) – Finance Code

Acknowledgments

Authors are grateful to all physician, and other health service professionals and researchers, specially Moisés Henrique Mastella that help in data collection of this study.

REFERENCES

Asher A., 2011. **Disfunção cognitiva entre sobreviventes de câncer.** *Sou J Phys Med Rehabil.*, 90, 16-26.

Bagnall-Moreau C. et al., 2019. **Chemotherapy-Induced Cognitive Impairment Is Associated with Increased Inflammation and Oxidative Damage in the Hippocampus.** *Mol Neurobiol.*, 56, 1-14.

Barbisan, F. et al., 2014. **Methotrexate-Related Response on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be Modulated by the Ala16Val-SOD2 Gene Polymorphism.** *PLoS ONE*, 9(10), e107299.

Chiou S.S. et al., 2019. **A cross-sectional follow-up study of physical morbidities, neurocognitive function, and attention problems in post-treatment childhood acute lymphoblastic leukemia survivors.**

Kaohsiung J Med Sci., 35, 373-378.

Christie L.A. et al., 2012. **Função cognitiva prejudicada e neurogênese hipocampal após quimioterapia para câncer.** Clin Cancer Res., 18, 1954-1965.

Davis J. et al., 2013. **Farmacoterapia emergente para pacientes com câncer com disfunção cognitiva.** BMC Neurol., 13, 153.

Eren O.E. et al., 2015. [Cognitive Function in Patients Before and After Micro-neurosurgical Resection of Frontal Brain Tumors].
Fortschr Neurol Psychiatr., 83, 628-633.

Gläscher J. et al., 2019. Model-based lesion mapping of cognitive control using the Wisconsin CardSorting Test. Nat Commun., 10, 20.

Hong Lang. et al., 2014. **Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity Authors: Mei Songbo.** J Clin Biochem Nutr., 54, 151-160.

Janelins M.C. et al., 2012. **Differential expression of cytokines in breast cancer patients receiving different chemotherapies: implications for cognitive impairment research.**
Support Care Cancer., 20, 831-839.

Keeney J.T.R. et al., 2018. Doxorubicin-induced elevated oxidative stress and neurochemical alterations in brain and cognitive decline: protection by MESNA and insights into mechanisms of chemotherapy-induced cognitive impairment ("chemobrain"). Oncotarget., 9, 30324-30339.

Koppelmans V. et al., 2014. **Integridade global e focal da substância branca em sobreviventes de câncer de mama após 20 anos de quimioterapia adjuvante.** Hum Brain Mapp., 35, 889-899.

Lange M., Joly F., 2017. **Como identificar e gerenciar a disfunção cognitiva após o tratamento do câncer de mama.** J Oncol Pract., 13, 784-790.

Li C. et al., 2018. **Macrophage polarization and meta-inflammation.** Transl Res., 191, 29-44.

Li T.Y. et al., 2018. **Investigation of chemotherapy-induced brain structural alterations in breast cancer patients with generalized q-sampling MRI and graph theoretical analysis.** BMC Cancer., 18, 1211.

Li X.J. et al., 2014. Effects of sertraline on executive function and quality of life in patients with advanced cancer. Med Sci Monit., 20, 1267-1273.

Liao D. et al., 2018. Efeitos neuroprotetores do dl-3-n-butiltalida contra a neuroinflamação induzida pela doxorubicina , estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e alterações comportamentais. *Oxid Med Cell Longev.*, 9125601.

Shichiri M., 2014. **The role of lipid peroxidation in neurological disorders.** *J Clin Biochem Nutr.*,54,151-60.

Mu Y.G., et al. 2012. Working memory and the identification of facial expression in patients with left frontal glioma. *Neuro Oncol.*, 14, 81-89.

Netterberg I. et al., 2018. The risk of febrile neutropenia in breast cancer patients following adjuvant chemotherapy is predicted by the time course of interleukin-6 and C-reactive protein by modelling. *Br J Clin Pharmacol.*, 84, 490-500.

Ren X. et al., (2019). Mecanismos bioquímicos plausíveis de comprometimento cognitivo induzido por quimioterapia ("chemobrain"), uma condição que prejudica significativamente a qualidade de vida de muitos sobreviventes de câncer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*, 1865, 1088-1097.

Ren X. et al., 2018. The triangle of death of neurons: Oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and loss of choline-containing biomolecules in brains of mice treated with doxorubicin. Advanced insights into mechanisms of chemotherapy induced cognitive impairment ("chemobrain") involving TNF- α . *Free Radic Biol Med.*, 134, 1-8.

Rodgers J. et al., 2003. Attentional ability among survivors of leukaemia treated without cranial irradiation. *Arch Dis Child.*, 88, 147-50.

Songbo M. et al., 2019. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett.*, 307, 41-48.

Vardy J., Rourke S., Tannock I.F., 2007. **Avaliação da função cognitiva associada à quimioterapia: uma revisão de estudos publicados e recomendações para pesquisas futuras.** *J Clin Oncol.*, 25, 2455-2463.

Wefel J. S., Schagen S. B., 2012. **Chemotherapy-Related Cognitive Dysfunction.** *Curr Neurol Neurosci Rep.*, 12, 267.

Yang J., Guo J., Jiang X., 2017. Executive function in cancer patients with posttraumatic stress disorder. *Int J Psychiatry Med.*, 52, 137-146.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Comparison between expected therapeutic and side effects of chemotherapy drugs on body metabolism of women with breast cancer (BC) diagnosis. In order to trigger apoptosis/necrosis of tumoral cells chemo-drugs trigger oxidative stress and a transient inflammatory state. This state will be finished until next chemo cycle that occur each 21 days. Some women will develop side effects by generation of higher oxidative stress and inflammatory response that could increase permeability of body brain barrier (BBB) generating neurotoxic states and subsequent brain lesions, such as executive deficits. LPX= lipoperoxidation; PC= protein carbonylation; NO= nitric oxide; ROS= reactive oxygen species; BBB= blood-brain barrier; IL= interleukin; TNF α = tumor necrosis factor alpha; IFN γ = interferon gamma

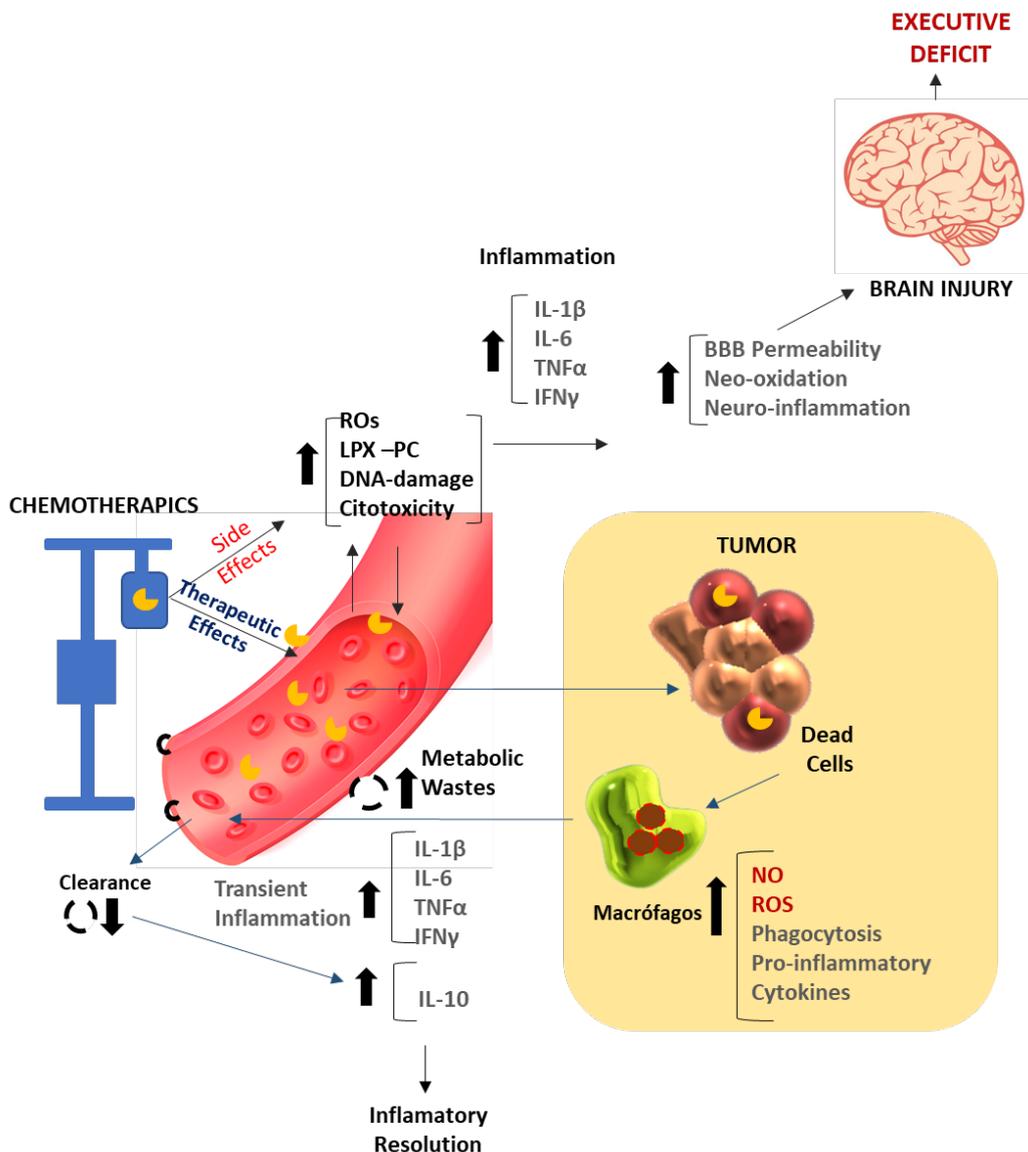


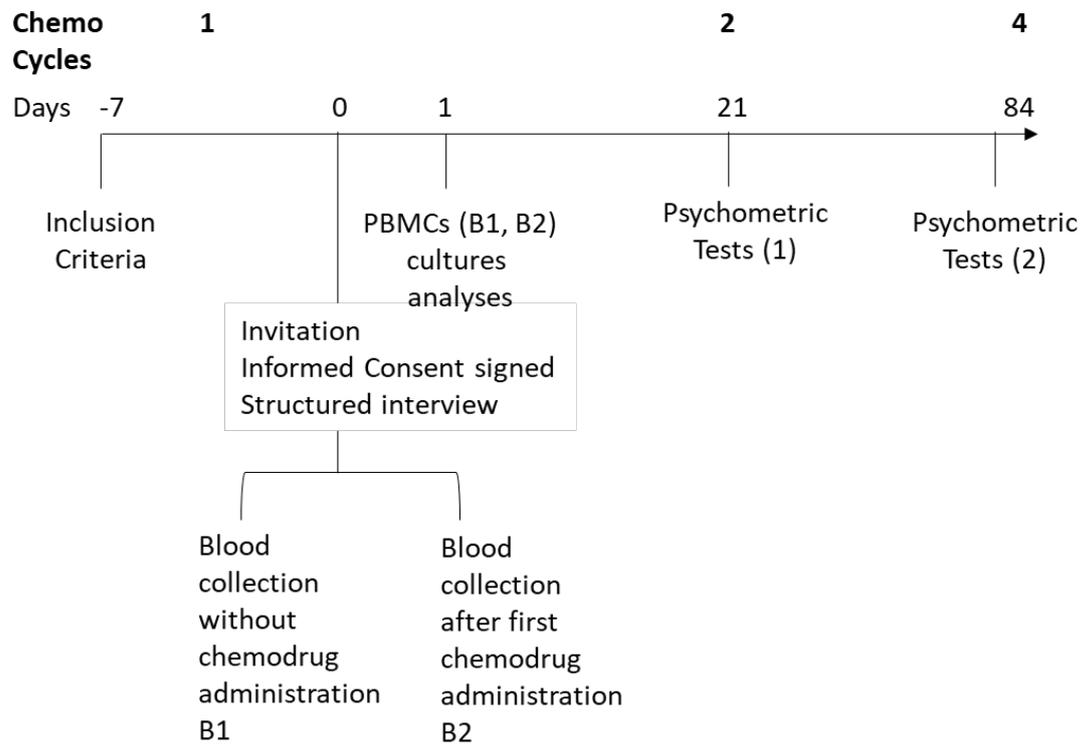
Figure 2 General study design

Figure 3 Frequency of deficit executive (DE) determined by the WCST test in women with breast cancer in the 2nd and 4th cycles of chemotherapy. The following categories were used to determine the cognitive deficit: CA = completed categories and PE = perseverative errors. SDE = women without any type of executive decline and ED = women with cognitive decline in at least one of the two cycles of chemotherapy and in one of the analysed variables (CA and PE) of the WCST test. Comparisons between the cycles shown in Figure 3A were made by Fisher's exact non-parametric test. Significance with $p \leq 0.05$.

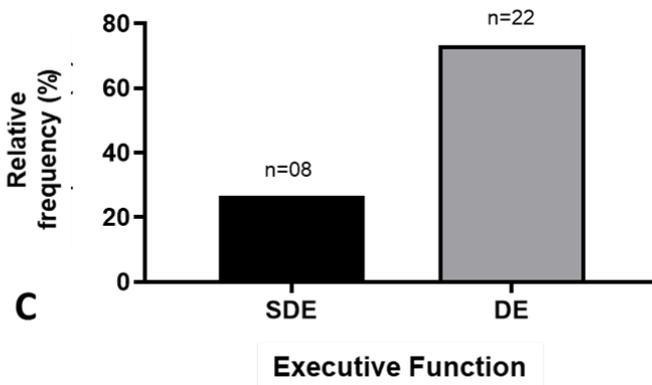
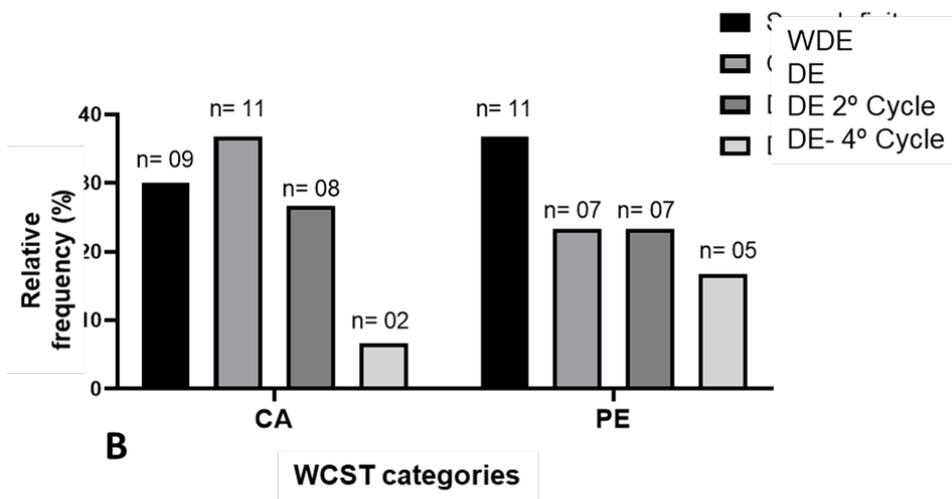
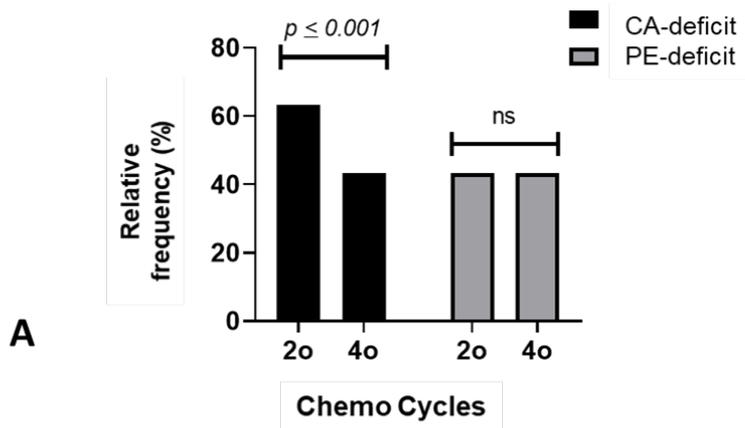


Figure 4 Association between high levels of lipoperoxidation (LP) in cultures of 24 h of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from blood samples from women with breast cancer after the first exposure to chemotherapy. (A) Graph of the ROC curve determining the predictive value of lipoperoxidation levels; (B) Comparison of women with CMSPs with LP levels > 0.1 by Fisher's exact test.

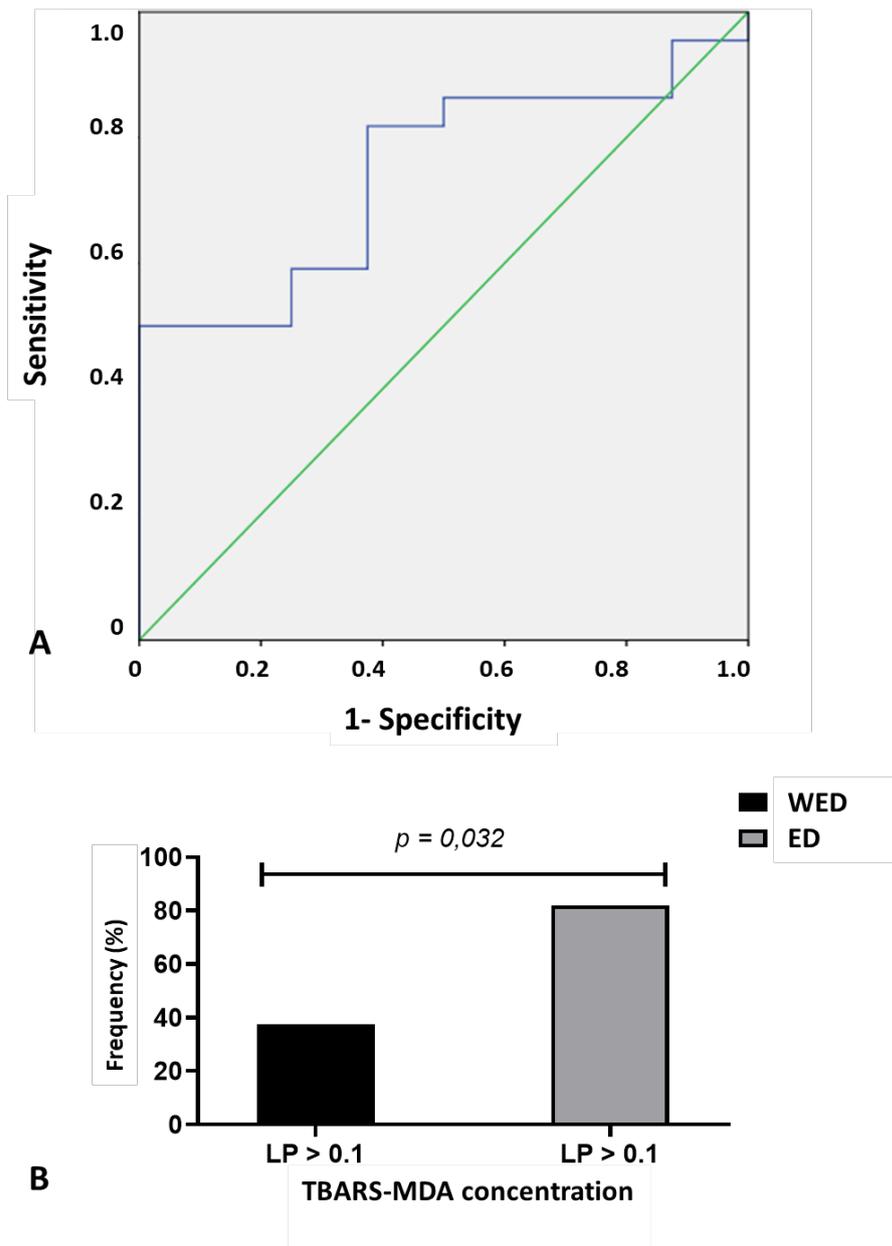
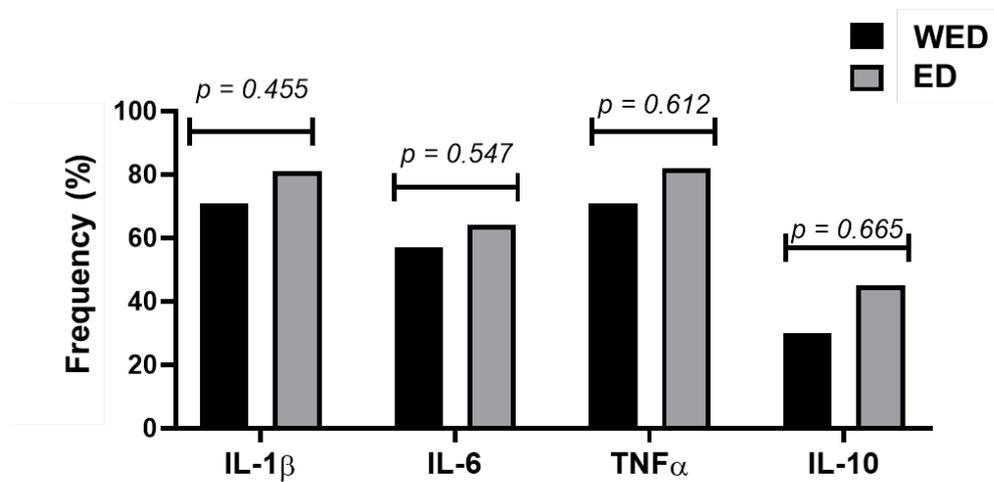


Figure 5 Comparison of the frequency of women in the ED group with overexpression of inflammatory cytokine genes (> 1.5-fold compared to the WED and ED groups) evaluated in 24-hour cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from blood samples immediately after first intravenous chemotherapy administration. The comparison was made by Fisher's exact test. Results showed a significant increase in cytokine expression in both the WED and ED-groups. Groups were compared by Fisher Exact non-parametric test with significant $p \leq 0.05$.

**Patients with cytokine genes over-expressed
in Che-PBMC 24 h cell cultures**





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br