

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSÉ MAURO MORAES DOS SANTOS

**ENVOLVIMENTO DOS FATORES NEUROTRÓFICOS
NA MEMÓRIA DE ANIMAIS JOVENS E VELHOS
TRATADOS COM *GINKGO BILOBA***

**CRICIÚMA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S237e Santos, José Mauro Moraes dos.

Envolvimento dos fatores neurotróficos na memória de animais jovens e velhos tratados com *Gingko Biloba* / José Mauro Moraes dos Santos ; orientadora : Josiane Budni. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

63 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. *Gingko Biloba* – Uso terapêutico. 2. Envelhecimento. 3. Fator neurotrófico derivado do cérebro. 4. Fator neurotrófico derivado da célula Glia. I. Título.

CDD 22. ed. 615.321

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

JOSÉ MAURO MORAES DOS SANTOS

**ENVOLVIMENTO DOS FATORES NEUROTRÓFICOS
NA MEMÓRIA DE ANIMAIS JOVENS E VELHOS
TRATADOS COM *GINKGO BILOBA***

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre em Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Josiane Budni


**CRICIÚMA
2016**



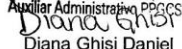
UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – N° 248

Com início às 10h00 (dez horas) do dia 29 (vinte e nove) do mês de fevereiro de 2016 (dois mil e dezesseis), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **José Mauro Moraes dos Santos**, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Josiane Budni, intitulada **“Envolvimento dos fatores neurotróficos na memória de animais jovens e velhos tratados com ginkgo biloba”**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.^a Dr.^a Gabriela Trevisan dos Santos (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof.^a Dr.^a Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 11h30 (onze horas e trinta minutos), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza Coordenador do Programa. Criciúma, 29 (vinte e nove) de fevereiro de 2016 (dois mil e dezesseis).


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador PPGCS

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

Diana Ghisi Daniel
Auxiliar Administrativo PPGCS

Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências - NEUROLAB - do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - PPGCS.

AGRADECIMENTOS

Nunca estamos sozinhos em nossas jornadas e não há como não sermos gratos a todos aqueles que nos apoiaram nessa caminhada.

Inicialmente faço menção, a base de nossa existência, a família, meus filhos, Gustavo, Gabriel e Augusto, minha esposa, Luciane, meus pais, José e Ceres Helena, e meus irmãos André Luiz e Ana Helena.

Logo após a família, deixo meu agradecimento aos amigos, aqueles à que nos afinamos, que mesmo distantes se fazem presentes, que entendem nossa ausência, que nos trazem alegrias e também dividem nossas tristezas.

Também sou muito grato, aos colegas e professores, tanto do Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde quanto do Curso de Medicina, pela atenção, disposição e ensinamentos que facilitaram e enriqueceram meu trabalho.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Neurociências e Unidade de Neurodegeneração, especialmente a Amanda da Silva Barcellos, Cenita Pereira Borges, Francielle Mina, Michelle Lima Garcez, e Tatiani Bellettini Santos, os quais tiveram papel fundamental de cooperação e apoio para alcançarmos nossos objetivos.

Certamente, uma das pessoas mais importantes dessa jornada foi minha orientadora, a Prof^ª. Dr^ª. Josiane Budni, na qual tive o imenso prazer de conviver e trabalhar, que sempre esteve atenta e solícita as minhas demandas, que soube orientar os trabalhos magistralmente, que tenho como referência de educadora e, muito admiro tanto pela sua sabedoria quanto pela dedicação aos seus alunos.

Finalmente, a Universidade do Extremo Sul Catarinense, na figura de todos os seus funcionários, da Reitoria, Pró-Reitores e da equipe do Desenvolvimento Humano que, direta e indiretamente, contribuíram para que eu empreendesse essa conquista.

RESUMO

O envelhecimento é uma deterioração progressiva de todos os mecanismos homeostáticos acompanhada por declínio cognitivo. Tal fato assume grande importância uma vez que, ao longo das últimas décadas, o aumento da expectativa de vida e, da população idosa representa um aumento na incidência e na prevalência das demências. Recentes avanços da biologia em modelos animais, associados com estudos moleculares e celulares do cérebro, estão começando a elucidar tais mecanismos e seus potenciais papéis no declínio cognitivo. O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb), é muito utilizado para demência e comprometimento cognitivo, principalmente relacionados ao envelhecimento, e parece atuar modificando as vias de sinalização do BDNF, NGF e GDNF. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração diária de EGb na função cognitiva em animais jovens e, em processo de envelhecimento. Foram utilizados ratos Wistar machos adultos com 2, 6, 16 e 24 meses de vida. Os animais foram submetidos à avaliação comportamental de habituação ao campo aberto ou esquiava inibitória 24h após o último tratamento. Após, os animais que foram submetidos ao campo aberto sofreram eutanásia e as estruturas cerebrais (hipocampo e córtex pré-frontal) foram retiradas para análises dos níveis de BDNF, NGF e GDNF. Os resultados mostram que os animais com 2 e 6 meses reconheceram o ambiente novo após a segunda exposição ao campo aberto, ou seja, não apresentaram dano na memória de habituação. Porém, animais com 16 e 24 meses apresentaram dano na memória de habituação. Este efeito foi revertido com a administração de EGb durante 30 dias em animais com 24 meses de idade, mas não com 16 meses. Os animais submetidos à tarefa de esquiava inibitória tiveram um perfil semelhante. Além disso, foi observado que houve aumento dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal de ratos com 6 e 24 meses de idade e tratados com EGb. No hipocampo, apenas houve aumento dos níveis de BDNF em ratos com 24 meses e tratados com EGb. Os resultados também mostram que houve aumento dos níveis de NGF no córtex pré-frontal de ratos com 16 meses de idade tratados com água ou EGb. No hipocampo, apenas houve aumento dos níveis de NGF em ratos com 6 meses e tratados com EGb. Adicionalmente, foi observado aumento dos níveis de GDNF no córtex pré-frontal de ratos com 6 meses de idade tratados com água. Também houve aumento dos níveis de GDNF no córtex pré-frontal de animais com 16 meses e tratados com água ou EGb. No hipocampo, não houve alteração dos níveis de GDNF em nenhum dos grupos

experimentais. Os resultados desse estudo indicam que o EGb reverteu o dano cognitivo induzido pelo envelhecimento em ratos com 24 meses de idade e este efeito pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo aumento dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo desses ratos. Em animais jovens o EGb não induziu dano cognitivo.

Palavras-chave: BDNF; envelhecimento; GDNF; *gingko billoba*; memória; NGF.

ABSTRACT

The aging is a progressive deterioration of all homeostatic mechanisms accompanied by cognitive decline. This fact is relevant since over the past decades the life expectancy and the aging population represents an increase in the incidence and prevalence of dementia. Current advances in biology in animal models, related with molecular and cellular studies of the brain, are beginning to shed light on these mechanisms and their potential roles in cognitive decline. *Ginkgo biloba* extract (EGb) is widely used for dementia and cognitive impairment, especially related to aging and seems to act by modifying the signaling pathways of BDNF, NGF and GDNF. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of daily administration of EGb on cognitive function in young animals and in aging process. Adult male Wistar rats were used with 2, 6, 16 and 24 months of life. The animals was submitted to behavioral assessment of habituation to the open field or inhibitory avoidance task, 24 hours after the last treatment. Afterwards the animals subjected to open field were killed and the brain structures (hippocampus and prefrontal cortex) were removed for analysis of the levels of BDNF, NGF and BDNF. The results show that animals 2 and 6 months recognized the new environment after the second exposure open field thus not exhibited damage in habituation. However, animals with 16 and 24 months showed damage in habituation memory. This effect was reversed by the administration of EGb for 30 days in animals 24 months of age, but not at 16 months. One similar profile were observed in animals subject to inhibitory avoidance task. Moreover it was observed that there was an increase in BDNF levels in the prefrontal cortex of rats at 6 and 24 months of age and treated with EGb. In the hippocampus there was only increased BDNF levels in rats at 24 months and treated with EGb. The results also show that there was an increase of NGF levels in the prefrontal cortex of rats 16 months old treated with water or EGb. In the hippocampus, there was only increased NGF levels in rats at 6 months and treated with EGb. Further there was an increase in BDNF levels in prefrontal cortex of rats at 6 months of age treated with water. There was also increase BDNF levels in prefrontal cortex of animals 16 months and treated with water or EGg. There was no change in BDNF levels in both experimental groups in the hippocampus. The outcomes of this study indicate that EGb reverted the cognitive impairment induced by aging in rats at 24 months of age and this effect can be explained at least partially by increased BDNF levels in the prefrontal cortex and hippocampus of these mice. In young animals the EGb not induced

cognitive impairment.

Keywords: Aging; BDNF; *Ginkgo biloba*; GDNF; memory; NGF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fatores neurotróficos e a interação com seus receptores. (a) Receptor de BDNF ou pró-BDNF.....	30
Figura 2 - Desenho experimental	36
Figura 3 - Efeito do envelhecimento e do extrato de <i>Gingko biloba</i> (EGB) no teste de memória de habituação ao campo aberto.....	40
Figura 4 - Efeito do envelhecimento e do extrato de <i>Gingko biloba</i> (EGB) no teste de memória aversiva avaliado na esQUIVA inibitória.....	41
Figura 5 - Efeito do envelhecimento e do extrato de <i>Gingko biloba</i> (EGB) nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistar.....	42
Figura 6 - Efeito do envelhecimento e do extrato de <i>Gingko biloba</i> (EGB) nos níveis de NGF no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistar.....	43
Figura 7 - Efeito do envelhecimento e do extrato de <i>Gingko biloba</i> (EGB) nos níveis de GDNF no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistar.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPC - Adenosina Monofosfato Cíclico (do inglês, *cyclic Adenosine Monophosphate*)
- BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain-derived Neurotrophic Factor*)
- CREB – Proteína de Resposta ligada ao AMPC (do inglês, *cAMP Response Element-binding protein*)
- DA - Doença de Alzheimer
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)
- EGb / EGB - Extrato de *Ginkgo biloba*
- ELISA - Ensaio de Imuno-absorção Enzimática (do inglês, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)
- EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
- GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Célula Glia (do inglês, *Glial Cell-derived Neurotrophic Factor*)
- GFR $\alpha 1$ - Receptor $\alpha 1$ (do inglês, *Glial Factor Receptor alpha1*)
- HRP - Peroxidase de Rábano (do inglês, *Horseradish Peroxidase*)
- LTD - Depressão de Longa Duração (do inglês, *Long-term Depression*)
- LTP - Potenciação de Longa Duração (do inglês, *Long-term Potentiation*)
- MAPK - Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (do inglês, *Mitogen-activated Protein Kinases*)
- NGF - Fator de Crescimento do Nervo (do inglês, *Nerve Growth Factor*)
- NMDA - N-metil-D-aspartato (do inglês, *N-methyl-D-aspartate*)
- NTF3 - Neurotrofina-3 (do inglês, *Neurotrophin-3*)
- NTFs - Fatores Neurotróficos (do inglês, *Neurotrophic Factors*)
- p75NTR - Receptor de Neurotrofina p75 (do inglês, *p75 Neurotrophin Receptor*)
- RET - Receptor Tirosina-quinase (do inglês, *Receptor Tyrosine Kinase*)
- TBS - Tampão Salino Tris (do inglês, *Tris-buffered Saline*)
- TMB - Tetrametilbenzidina (do inglês, *Tetramethylbenzidine*)
- TrkA - Quinase Tropomiosina-relacionada A (do inglês, *Tropomyosine-related Kinase A*)
- TrkB - Quinase Tropomiosina-relacionada B (do inglês, *Tropomyosine-related Kinase B*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 ENVELHECIMENTO	25
1.2 COGNIÇÃO E ENVELHECIMENTO	27
1.3 FATORES NEUROTROFICOS E ENVELHECIMENTO	28
1.4 GINKGO BILOBA	32
1.5 JUSTIFICATIVA	34
2 OBJETIVO GERAL	35
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAS E MÉTODOS	36
3.1 ANIMAIS	36
3.2 TRATAMENTO	36
3.3 TESTE DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO	37
3.4 ESQUIVA INIBITÓRIA	37
3.5 COLETA DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS	37
3.6 ANÁLISES MOLECULARES	38
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 RESULTADOS	40
4.1 MEMÓRIA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO	40
4.2 MEMÓRIA AVERSIVA NA ESQUIVA INIBITÓRIA	41
4.3 NÍVEIS DE BDNF EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO	42
4.4 NÍVEIS DE NGF EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO	43
4.5 NÍVEIS DE GDNF EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO	43
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO	62
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento está relacionado a mudanças morfofuncionais que ocorrem ao longo da vida de um indivíduo após a maturação sexual e conseqüentemente, de forma progressiva, comprometem a capacidade de responder aos estímulos ambientais levando a perda da homeostase. Também podemos definir o envelhecimento como consequência de tudo aquilo que ocorre no indivíduo com o passar do tempo (Jeckel-Neto, 2006). Adicionalmente, o mesmo termo pode ser entendido como uma etapa do processo natural da vida, cuja característica principal é a acentuada redução da capacidade de adaptação e conseqüente diminuição da expectativa de vida. Esta condição torna o indivíduo mais vulnerável e predisposto a morbidades e mortalidade (Borba et al., 2012).

Tanto a proporção quanto o número absoluto de idosos nas populações mundiais estão aumentando dramaticamente, sendo esta uma das razões do envelhecimento estar emergindo como uma questão crucial. Atualmente apenas o Japão excede uma proporção de 30% de idosos. Entretanto, nos meados desse século, muitos países irão ter uma proporção similar ao do Japão em 2012. Isso inclui países da Europa e América do Norte mas também, Chile, China, Iran, Korea, Russia, Tailândia e Vietnam (WHO, 2015).

A velocidade do envelhecimento da população em muitos países também é muito maior quando comparada ao passado. Por exemplo, enquanto a França levou cerca de 150 anos para se adaptar a mudanças de 10% para 20% na proporção da população idosa acima de 60 anos, lugares como o Brasil, China e Índia terão um pouco menos de 20 anos para fazer a mesma adaptação. Isso significa que a adaptação desses países precisa ser empreendida mais rapidamente do que foi no passado (WHO, 2015).

Muitas teorias foram elaboradas para explicar o processo de envelhecimento. Tais teorias podem ser geralmente classificadas como: evolucionárias, envolvendo aspectos históricos e evolucionários do envelhecimento; e fisiológicas ou mudanças estruturais e funcionais (Cefalu, 2011). Alguns processos podem explicar estas teorias ao nível celular como: mecanismos temporais intrínsecos e sinalizadores, eventos acidentais ao acaso, sinalizações genéticas programadas que tornam o organismo mais suscetível há eventos acidentais, mutações ou lesões no DNA nuclear ou mitocondrial, proteínas danificadas ou

anormais, ligações cruzadas, glicação, acúmulo de resíduos, desgaste molecular generalizado, formação de radicais livres e componentes celulares específicos como genes, cromossomos, a mitocôndria ou os telômeros (Jeckel-Neto, 2006; Cefalu, 2011). Além disso, estão relacionados ao envelhecimento processos fisiológicos como o estresse oxidativo, imunológico, neuroendócrino, metabólico, sinalização da insulina e restrição calórica (Pacala e Sullivan, 2010). Portanto, as principais teorias que podem explicar o envelhecimento envolvem:

- Estresse oxidativo: postula que espécies reativas de oxigênio (EROs) resultam no acúmulo de proteínas, lipídios e DNA com dano oxidativo (Niranjan, 2012). As EROs podem ser um sinal para o envelhecimento podendo determinar o desenvolvimento do mesmo. Isso é evidenciado pelo fato de que mudanças na via do estresse oxidativo pode determinar longevidade ao indivíduo (Niranjan, 2012; Rinnerthaler et al., 2015). No entanto, muitos estudos envolvendo vitaminas antioxidantes com o objetivo de reduzir o estresse oxidativo ainda não conseguiram apresentar resultados interessantes contra o envelhecimento (Zasshi, 2010).

- Alterações cromossômicas: algumas instabilidades cromossômicas como deleções, mutações, translocações e poliploidia são adquiridas com a idade e contribuem para o silenciamento ou expressão de genes específicos (Jeckel-Neto, 2006). Isso é evidenciado, uma vez que mutações no DNA mitocondrial e nas vias de estresse oxidativo podem contribuir para reduzir a resistência ao estresse oxidativo (Rinnerthaler et al., 2015).

- Autoimune: postula que o corpo humano comece a produzir auto-anticorpos contra os seus próprios tecidos resultando em infecções, doenças crônicas, câncer e particularmente doenças autoimunes como artrite reumatoide e lúpus, contribuindo para o processo de envelhecimento (Kent, 1997; Jeckel-Neto, 2006).

- Neuroendocrinológica: é outra teoria que envolve o processo do envelhecimento, baseada no fato de que níveis altos de cortisol estão relacionados ao estresse crônico. Este contribui para infecções, déficit cognitivo, função muscular prejudicada e doenças crônicas que, com o passar do tempo, contribuem para processo de envelhecimento. (Cefalu, 2011; Nirjam, 2012).

- Genética-desenvolvimental: o envelhecimento pode ser relacionado com a herança genética, uma vez que genes específicos podem contribuir pra a longevidade em um indivíduo (Jeckel-Neto, 2006). A sustentação dessa teoria está relacionada à supressão ou ativação de genes específicos ligados ao envelhecimento (Lagaay, 1991).

- Restrição calórica: associada às mutações nas vias de sinalização da insulina resultam em alterações no tamanho e composição corporal, contribuindo para a resistência ao estresse oxidativo e longevidade em muitas espécies (leveduras, vermes, moscas e roedores). Portanto, a restrição calórica também constitui uma teoria para o envelhecimento (Jeckel-Neto, 2006; Yu et al., 2007).

- Telomérica: postula que células somáticas normais têm uma expectativa finita de vida e a perda do DNA telomérico quando elas se dividem é em função do envelhecimento. A enzima telomerase acrescenta repetições de telômeros ao final dos cromossomos (Jeckel-Neto, 2006). O encurtamento crítico do DNA telomérico devido à perda da enzima telomerase é um sinal para iniciação da senescência celular (Vaziri e Benchimol, 1998; Artandi, 2006).

O processo de envelhecimento, essencialmente, tem natureza multifatorial uma vez que, depende da programação genética e das alterações que vão ocorrendo em níveis celular e molecular. Estas resultarão na aceleração ou desaceleração do envelhecimento e consequente redução da massa celular ativa, diminuição da capacidade funcional das áreas afetadas e sobrecarga em menor ou maior grau dos mecanismos de controle homeostático (Hara et al, 2014).

1.2 COGNIÇÃO E ENVELHECIMENTO

Como o processo de envelhecimento é acompanhado por mudanças estruturais estereotipadas e neurofisiológicas no cérebro gerando uma deterioração progressiva de todos os mecanismos homeostáticos cerebrais e, acompanhado por declínio cognitivo (Bishop et al., 2010; Meyers et al., 2016). Isso é um grande problema, visto que o aumento da expectativa de vida e da população idosa representa um aumento na incidência e na prevalência das demências (Niranjan, 2012). Neste contexto, o declínio cognitivo emergiu como uma das maiores ameaças ao idoso, já que cerca de 30% dos adultos acima de 85 anos são acometidos pela Doença de Alzheimer (DA). Portanto, manter a memória e cognição do idoso saudável é uma das prioridades, para que os indivíduos senescentes possam manter-se independentes de seus familiares e capazes de realizar todas as atividades cotidianas (von Strauss et al., 1999).

O declínio do estado cognitivo pode ser observado por déficits de memória, de funções executivas e incapacidade para uso estratégico da informação adquirida, facilitado pelo desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Ismail et al., 2011). As alterações que ocorrem com

o processo de envelhecimento normal estão relacionadas com a redução na eficácia de três recursos chave do processamento cognitivo: a velocidade com que a informação é processada, a memória de trabalho e as capacidades sensoriais e perceptuais (Park, 1999). O córtex pré-frontal é extensivamente estudado por seu papel crítico na função executiva, enquanto o hipocampo e outras regiões corticais relacionadas são os principais alvos de pesquisa para a função de memória (Hara e Morrison, 2014).

O envelhecimento tem papel fundamental no declínio cognitivo (Meyers et al., 2016), uma vez que regiões distintas do cérebro a qual interagem para promoverem funções cognitivas superiores demonstram ativação menos coordenada com o envelhecimento, sugerindo uma perda global da função integrativa. Salienta-se que essa coordenação reduzida da atividade cerebral está associada com um pobre desempenho em muitos domínios cognitivos (Andrews-Hanna et al., 2007; Thomas, 2016). Além da menor integração, a atividade neuronal também se torna menos localizada em algumas regiões cerebrais, particularmente no córtex pré-frontal, para resposta a tarefas de nível executivo. Diferentemente, adultos jovens ativam regiões cerebrais mais discretamente para executar as mesmas tarefas e integram regiões mais estreitamente com outras regiões do cérebro. Indivíduos idosos que exibem atividade deslocada apresentam melhor performance cognitiva que os indivíduos idosos com atividade mais localizada, consistente com a ideia de que o deslocamento pode ser uma resposta compensatória (Cabeza, 2002). Tais observações sugerem que sistemas biológicos executivos superiores do cérebro são alterados significativamente pelo envelhecimento normal na ausência de doença (Bishop, 2010; Antonenko e Flöel, 2014).

O colapso dependente da idade nos sistemas cerebrais executivos superiores está relacionado, em parte, ao rompimento das fibras mielinizadas que conectam os neurônios em regiões corticais diferentes. Apesar da perda neuronal mínima na maioria das regiões corticais, no envelhecimento cerebral normal mudanças na fisiologia sináptica de neurônios envelhecidos podem contribuir para a conectividade alterada e em maior escala na sua integração (Andrews-Hanna et al., 2007).

1.3 FATORES NEUROTRÓFICOS E ENVELHECIMENTO

Os fatores neurotróficos (NFs) estão envolvidos no processo de envelhecimento cerebral. Estes são peptídeos secretados que agem como

fatores de crescimento para o desenvolvimento fenotípico e manutenção de populações neuronais específicas no sistema nervoso de vertebrados, em desenvolvimento e de adultos (Siegal e Chauhan, 2000; Budni et al., 2015).

Essas proteínas difusíveis que agem via sinalização retrógrada de neurônios alvo e por mecanismos parácrinos e autócrinos regulam muitos aspectos da estrutura e função neural e glial. Fatores neurotróficos não promovem apenas a diferenciação e crescimento de neurônios em desenvolvimento, a manutenção fenotípica e sobrevivência de neurônios adultos mas também, representam um meio potencial de modificar uma disfunção neuronal, a ativação astrocitária e reações inflamatórias sob condições patológicas. Os fatores neurotróficos, sob certas condições, também modulam a plasticidade neuronal que decai durante o envelhecimento e, sob condições traumáticas ou degenerativas (Blesch et al., 1998).

Dentre os fatores neurotróficos, encontram-se o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), fator de crescimento derivado do nervo (NGF) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), os quais exercem seus efeitos não somente na sobrevivência celular, mas também em atividades como aprendizagem, memória e comportamento (Figura 1) (Mattson et al., 2002; Allen et al., 2013; Budni et al., 2015).

O BDNF é expresso diferentemente através de muitos tecidos cerebrais. Nutrição, metabolismo, comportamento e estresse afetam a sua expressão no sistema nervoso central e periférico (Fuchikami, 2009). O BDNF é sintetizado a partir de uma isoforma pró-BDNF, que então é clivado proteoliticamente (remoção do domínio N-terminal) dentro do neurônio ou após ser liberado gerando sua forma proteica final (Ahmed, 2015). Essa neurotrofina madura liga-se aos receptores de neurotrofina tirosina quinase (TrK). O BDNF é crucial no aprendizado e na memória, uma vez que ele regula a depressão de longa duração (LPD) e a potenciação de longa duração (LTP), a plasticidade sináptica, o crescimento axonal, a proliferação da árvore dendrítica, e a diferenciação neuronal (Murer et al., 2001; Tyler et al., 2002). Esses mecanismos no sistema nervoso central são ativados através da interação do BDNF com receptores TrK (Islam et al., 2009). O pro-BDNF liga-se ao receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) (Hibbert et al., 2006). Diferentemente, quando o pró-BDNF se liga ao p75NTR ativa vias apoptóticas em neurônios periféricos e células glia (Figura 1) (Teng et al., 2006; Budni et al., 2015).

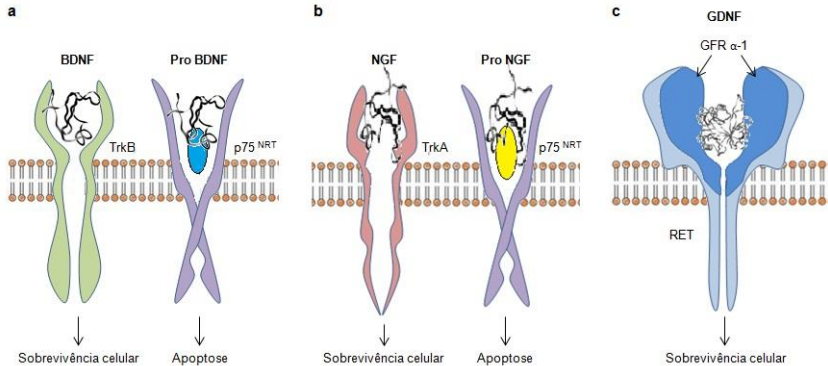


Figura 1 - Fatores neurotróficos e a interação com seus receptores.

(a) Receptor de BDNF ou pró-BDNF. O BDNF liga-se ao receptor TrkB e essa interação induz a ativação de via de sinalização que culmina com a sobrevivência celular. Quando o pró-BDNF liga-se ao p75NTR pode levar à apoptose. (b) Receptor de NGF ou pró-NGF. O NGF liga-se ao receptor TrkA e essa interação induz a ativação de via de sinalização que culmina com a sobrevivência celular. Quando o pró-NGF liga-se ao p75NTR pode levar à apoptose. (c) Receptor de GDNF. O GDNF liga-se a complexo receptor multi-componente composto por GFR α 1 e RET induzindo a sobrevivência celular.

Fonte: Adaptado de Budni et al. (2015).

No envelhecimento ocorre prejuízo gradual das habilidades cognitivas as quais estão associadas às alterações corticais ou hipocâmpais (Tapia-Arancibia et al., 2008). O BDNF ajuda a proteger os neurônios dos danos causados por infecções. A expressão do BDNF no sistema nervoso é modificada por muitos insultos cerebrais como, convulsão, estresse, isquemia e hipoglicemia (Yan et al., 1997). Alterações na sua expressão do BDNF podem contribuir para algumas patologias como depressão, DA, Doença de Parkinson e epilepsia (Tapia-Arancibia et al., 2004). Neste contexto, níveis de BDNF podem indicar prejuízo na memória e na função cognitiva geral em mulheres idosas (Komulainen et al., 2008). Além disso, um estudo pré-clínico mostrou que a deficiência crônica de BDNF induz prejuízo no aprendizado em animais com 7 meses de idade (Petzold et al., 2015).

O NGF é sintetizado como um precursor pró-NGF e então secretado para fora das células ou clivado intracelularmente na forma madura de NGF. A secreção de NGF pode ser uma mistura de pró-NGF e NGF maduro clivado intracelularmente. Há três tipos de receptores de NGF, são eles, TrkA, p75 e sortilina. O efeito trófico do NGF é mediado através dos receptores TrkA e p75NRT (Chao e Hempstead, 1995;

Esposito et al., 2001), enquanto o efeito neurotóxico do pró-NGF é mediado através do receptor p75NTR em conjunção com sortilina (Nykjaer et al., 2004). O pró-NGF é a forma predominante do NGF no sistema nervoso central (Figura 1) (Fahnestock et al., 2001).

Há relatos que aumentos nos níveis de pró-NGF induzem apoptose, evidências indicam que o pró-NGF inibe a proliferação e diferenciação de células tronco ou neurais progenitoras do hipocampo em camundongos recém nascidos (Guo et al., 2013; Budni et al., 2015). Tais efeitos do pró-NGF podem ser mediados através p75NTR (Wang et al., 2010; Budni et al., 2015). Neste contexto, um estudo realizado por Al-Shawi et al (2008) indicou que o pró-NGF induziu morte de neurônios do prosencéfalo basal e neurônios periféricos sinápticos de ratos idosos. Este efeito não foi encontrado em animais jovens. Além disso, o pró-NGF esteve elevado durante o envelhecimento em algumas áreas de projeção de populações vulneráveis de neurônios centrais e periféricos (Al-Shawi et al., 2008). Terry et al., (2011) demonstrou prejuízos associados à idade no aprendizado espacial e déficits na memória de reconhecimento. Esses efeitos são comparáveis aos níveis elevados de pró-NGF, p75NTR e sortilina no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos envelhecidos (Terry et al., 2011). Fatores de crescimento, como o NGF, são importantes na plasticidade neuronal e sobrevivência de neurônios colinérgicos do prosencéfalo (córtex cerebral, hipocampo, núcleos da base e hipotálamo) nas quais estão ligados a memória (Korsching et al., 1985). Larkfors et al. (1987) encontrou níveis reduzidos de NGF no hipocampo de ratos Fischer com 28 meses, enquanto Perovic et al. (2013) demonstrou que os níveis de NGF estão diminuídos no córtex de ratos wistar com 24 meses. Considerando que o NGF é importante para funções cognitivas, e que foi encontrada redução com o envelhecimento, este fator neurotrófico pode contribuir para o declínio associado ao envelhecimento da função cognitiva (Larkfors et al., 1987; Hasenohrl et al., 1997). Portanto, ele exerce um papel significativo na memória e cognição, no desenvolvimento, sobrevivência e manutenção de neurônios colinérgicos (Yang et al., 2014) e também no envelhecimento cerebral.

O GDNF é um importante fator neurotrófico para o desenvolvimento, sobrevivência e manutenção dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (Deister e Schmidt, 2006; Lin et al., 1993). O GDNF interage com múltiplos componentes de complexos receptores pela ligação em componentes da superfície celular, receptor $\alpha 1$ do GDNF (GFR $\alpha 1$) e um receptor transmembranar de tirosinaquinase (Figura 1), tirosinaquinase receptor (RET) (Trupp et al., 1996; Baloh et al., 1997).

Sabe-se que a função motora e todo o sistema dopaminérgico sofre um declínio com o envelhecimento normal e, pacientes com Doença de Parkinson tem um declínio intenso neste sistema (Jankovic et al., 2008). O potencial do GDNF contra a deterioração cognitiva associada ao envelhecimento não foi totalmente explorada (Pertusa et al., 2008), há ensaios do efeito neurotrófico do GDNF contra a atrofia neuronal que causa déficits cognitivos em idosos, e eles encontraram que houve ganho significativo em habilidades cognitivas, nos testes de aprendizado espacial e memória, devido à exposição ao GDNF. Contudo, a especificidade do GDNF a área dopaminérgica é o motivo pela qual tem sido estudado seu uso potencial para o tratamento da Doença de Parkinson, nas quais ensaios clínicos atuais estão em andamento. Neste contexto, tem sido estudado a administração de GDNF como opção terapêutica para neurodegeneração (Allen et al., 2013). Já foi descrito que o GDNF pode exercer efeitos neuroprotetores e neuroreparadores na substância *nigra* em modelos animais de Doença de Parkinson, bem como em pacientes (Gill et al., 2003; Slevin et al., 2005).

Outros sistemas parecem também estar associados ao GDNF. Farrand et al. (2015) sugere que níveis reduzidos de GDNF induz liberação excessiva de glutamato e a desregulação do transportador de glutamato causa excitotoxicidade no sistema nervoso que precede a degeneração dopaminérgica. Neste sentido, um estudo realizado por Matsunaga et al. (2006), demonstrou que o nível de expressão do GDNF se elevou com o envelhecimento no córtex pré-frontal mas não no hipocampo.

Fox et al. (2001) indicou que GDNF pode proteger neurônios nigroestriatais dopaminérgicos contra os efeitos da 6-hidroxidopamina em idosos bem como em ratos adultos jovens. Além disso, um estudo adicional evidenciou um aumento significativo do conteúdo de GDNF na medula espinhal de ratos idosos (24 meses) submetidos há 2 semanas de exercício (McCullough et al., 2013). Portanto, estes estudos sugerem um papel importante do GDNF no processo de envelhecimento.

1.4 GINKGO BILOBA

O nome *Ginkgo* é derivado de uma tradução errada do nome japonês *Yin-Kwo* (fruta prateada), enquanto a espécie biloba se refere à forma bilobada das folhas (Singh et al., 2008). Esta planta é reconhecida como um “fóssil vivo” pela existência ininterrupta da espécie por 270 milhões de anos sem alterações e por ser a mais velha árvore no planeta, sem a coexistência de parentesco com outras espécies. Esta planta demonstrou alta resistência aos estresses ambientais, doenças microbianas

(micóticas, virais e bacterianas), outras pestes e poluentes gasosos (ozônio e SO₂) (Sinclair et al, 1987; Honda H, et al., 1997; Mohanta TK, 2012). *Ginkgo biloba* tem sido usada na medicina chinesa e tradicional para uma variedade de condições incluindo, asma, bronquite e disfunção cardíaca há pelo menos 5000 anos (Birks J, 2009). O uso medicinal da espécie tem atraído o interesse de pesquisadores. Várias partes da árvore são utilizadas na medicina ortodoxa ou tradicional para tratar doenças em função da grande quantidade de compostos bioativos (Isah T, 2015).

Os componentes ativos do *Ginkgo* são divididos em dois grandes grupos: flavonóides - as atividades farmacológicas dos flavonóides estão relacionadas com a sua ação antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, antiviral, e propriedades imuno-moduladoras (Middleton e Anne 1995) - e os terpenóides, sendo que os terpenóides são subdivididos em bilobalídeos (Curtis-Prior et al.,1999) que inibem o fator de agregação plaquetária (Glisson et al., 1999) e aumentam o fluxo sanguíneo cerebral (DeFeudis, 1998) e, os ginkgolídeos que são divididos em A, B, C e J, e têm ação anti-lipoperoxidativa.

O extrato padronizado do *Ginkgo biloba* (EGb), é um dos mais utilizados para demência e comprometimento cognitivo, deterioração relacionada à idade das funções mentais, fadiga, memória e continua a ser um dos extratos mais avaliados. Embora a sua base molecular detalhada ainda não seja totalmente compreendida, há evidências das propriedades neuroprotetoras, incluindo a habilidade em reduzir a agregação e toxicidade da peptídeo β -amiloide (Tan et al., 2014; Guan et al., 2014).

Pesquisas vêm buscando esclarecer o potencial de *Ginkgo biloba* nos processos de memória e efeito neuroprotetor em patologias. Recente estudo de Sakatani (2014) mostrou a melhora da função cognitiva em mulheres de meia idade após a ingestão de 120 mg/dia por 6 semanas de EGb.

Embora, estudos prévios tenham demonstrado resultados inconsistentes e falharam ao tirar conclusões definitivas quanto aos benefícios do *Ginkgo biloba* em pacientes com diagnóstico de declínio cognitivo ou demência. Estudo de meta-análise, também recente, demonstrou que EGb na dosagem de 240 mg/dia por 22-26 semanas é capaz de estabilizar ou retardar o declínio na cognição, função, e alterações globais na disfunção cognitiva e demência, especialmente para pacientes com sintomas neuropsiquiátricos (Tan et al., 2014). Outros resultados mostram um efeito neuroprotetor do EGb, uma vez que reduziu a apoptose neuronal no hipocampo nos modelos animais de amnésia induzida por escopolamina (Jahanshahi et al., 2013).

Alguns estudos mostram o envolvimento dos fatores neurotróficos no efeito protetor do EGb. Zhao (2012) investigou o efeito do EGb nos níveis de NGF e neurotrofina-3 (NT-3) em neurônios do hipocampo em ratos diabéticos tipo I induzidos por estreptozotocina. O EGb melhorou a capacidade de aprendizagem e a memória dos ratos diabéticos em relação aos ratos que receberam placebo. O mecanismo pode ser atribuído à expressão aumentada de NGF e NT-3 que reduziu a apoptose em neurônios do hipocampo. Em um estudo realizado por Zheng (2000), bilobalídeos provenientes do EGb promoveram aumento na expressão de GDNF em astrócitos de ratos. O estudo de Belviranlı e Okudan (2015) mostrou que a suplementação com EGb melhorou as funções cognitivas, diminuiu o estresse oxidativo e aumentou o nível de BDNF no cérebro de ratos. Portanto, EGb pode modular a cognição através de fatores neurotróficos.

1.5 JUSTIFICATIVA

Considerando, o efeito neuroprotetor do EGb no envelhecimento, a sua relação com os fatores neurotróficos (Zheng, 2000; Zhao, 2012; Belviranlı e Okudan, 2015); e que o envelhecimento torna o indivíduo mais vulnerável a morbidades como o declínio cognitivo (Bishop, 2010; Antonenko e Flöel, 2014.); o principal objetivo desse estudo é avaliar se administração diária de EGb altera os níveis de fatores neurotróficos e melhora a função cognitiva em animais jovens e em processo envelhecimento.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração diária crônica do EGb na memória os níveis de fatores neurotróficos em animais jovens e em processo de envelhecimento.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a memória em habituação ao novo ambiente através do campo aberto em ratos com 2, 6, 16 e 24 meses de idade e tratados durante 30 dias com o extrato de EGb;
- Avaliar a memória aversiva através da esQUIVA inibitória em ratos com 2, 6, 16 e 24 meses de idade e tratados durante 30 dias com o extrato de EGb;
- Avaliar os níveis de BDNF, GDNF e NGF em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos com 2, 6, 16 ou 24 meses de idade e tratados durante 30 dias com o extrato de EGb;

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar machos adultos com 2, 6, 16 e 24 meses de vida obtidos da colônia de reprodução do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais tiveram livre acesso à água potável e comida. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controlada, bem como em ciclo constante claro-escuro (12h claro e 12h escuro), e foram alocados 5 ratos por gaiola (n=160). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais, sob protocolo 074-2014-02.

3.2 TRATAMENTO

Os animais com 2, 6, 16 ou 24 meses de idade receberam 100 mg/kg do extrato liofilizado de *Ginkgo biloba* por 30 dias, por gavagem, sendo divididos os animais em 2 grupos experimentais em cada idade: água e EGb. Vinte e quatro horas após o último tratamento os animais foram submetidos à avaliação comportamental no teste de habituação ao campo aberto e esquiwa inibitória (Figura 2).

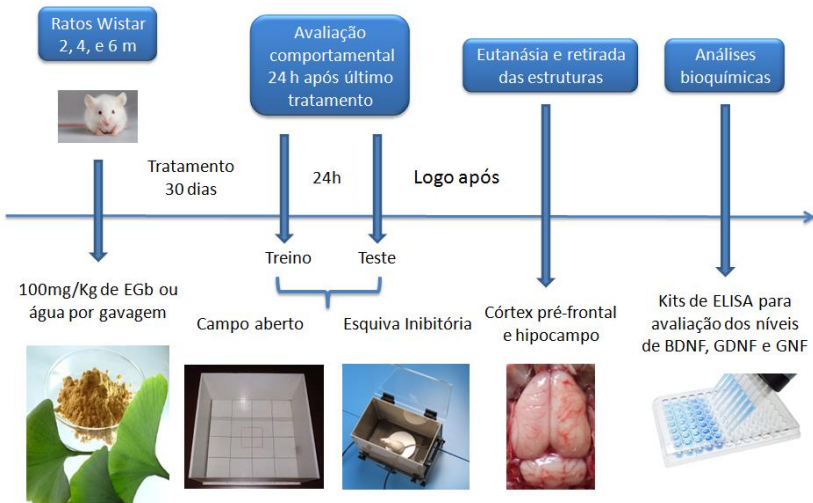


Figura 2 - Desenho experimental

Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

3.3 TESTE DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

O teste foi realizado em um campo aberto, medindo 38 x 38 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 paredes de madeira e parede frontal de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual exploraram livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repetiu o procedimento do treino. Os números de cruzamentos através das linhas pretas e o número de levantamentos foram avaliados em ambas as sessões (Vianna et al., 2000).

3.4 ESQUIVA INIBITÓRIA

Consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino, 24 horas após a última administração de EGb ou água, os animais serão retirados do biotério às 8:00 da manhã, e os animais serão colocados sobre a plataforma e medimos o tempo que o animal leva para descer com as quatro patas da plataforma. Esse tempo é denominado latência. Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebe um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal será novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele leva para descer (latência), porém não é administrado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste foram de 5s, 1,5h, e 24h para avaliar as memórias de imediata, de curta, e de longa duração, respectivamente (Izquierdo et al., 1998; Quevedo et al., 1999).

3.5 COLETA DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS

Após o teste comportamental de habituação ao campo aberto os animais sofreram eutanásia por decapitação na guilhotina e estruturas cerebrais como hipocampo e córtex pré-frontal foram retiradas e congeladas a -80°C para posteriores análises moleculares.

3.6 ANÁLISES MOLECULARES

As amostras de córtex pré-frontal e hipocampo de animais com 2, 6, 16 ou 24 meses de idade tratados ou não com EGb foram utilizadas para dosagens de fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF. Primeiramente, as amostras foram homogeneizadas em tampão TBS 0,01M (Tris, NaCl e ácido acético). Após, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000rpm e o sobrenadante retirado para as dosagens de fatores neurotróficos.

Os níveis de BDNF, NGF e GDNF no córtex pré-frontal e hipocampo, foram avaliados por *kits* comerciais ELISA, através do método sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante (NGF e BDNF da Chemicon®, EUA; GDNF da Biosensis®, EUA).

O *kit* ELISA sanduíche baseia-se na técnica padrão de ensaio da ligação de uma enzima imuno-absorvente. Um anticorpo monoclonal de rato específico para o BDNF, GDNF ou NGF foi pré-revestido em placas com 96 poços. Padrões e amostras de teste foram adicionados aos poços, um anticorpo policlonal biotilado de detecção de cabra específico para o BDNF, GDNF ou NGF foi adicionado subsequentemente e, em seguida, foi realizada a lavagem com tampão TBS. O Complexo Avidina-biotina-peroxidase foi adicionada e os conjugados não ligados foram lavados com tampão TBS. O substrato TMB HRP foi utilizado para visualização da reação enzimática HRP. O substrato TMB foi catalisado por HRP para produzir um produto de cor azul, que muda para amarelo após a adição de solução de parada da reação. A densidade do amarelo foi proporcional a quantidade de anticorpos para BDNF, GDNF e NGF, em relação à quantidade de amostra capturada na placa (de acordo com as dosagens de proteínas), a absorbância foi lida à 450nm. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry (1951) e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da memória de habituação e das análises bioquímicas foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via, conforme o protocolo experimental, seguida do teste *post hoc* de Newman Kewlls, quando apropriado. Os dados da tarefa de esquivia inibitória foram descritos como mediana \pm intervalo interquartil e as diferenças entre as sessões de teste e treino foram analisadas pelo teste de Wilcoxon. As comparações entre os

grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-wallis. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Os programas utilizados foram *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) 2.0 e *Statistica 7*.

4 RESULTADOS

4.1 MEMÓRIA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

A figura 3 A mostra o resultado do teste de habituação ao campo aberto quanto ao número de cruzamentos. Foi observado que os animais com 2 e 6 meses reconheceram o ambiente novo após a segunda exposição ao campo aberto, ou seja, não apresentaram dano na memória de habituação. Porém, animais com 16 e 24 meses apresentaram dano na memória de habituação. Este efeito foi revertido com a administração de EGb durante 30 dias em animais com 24 meses de idade, mas não com 16 meses.

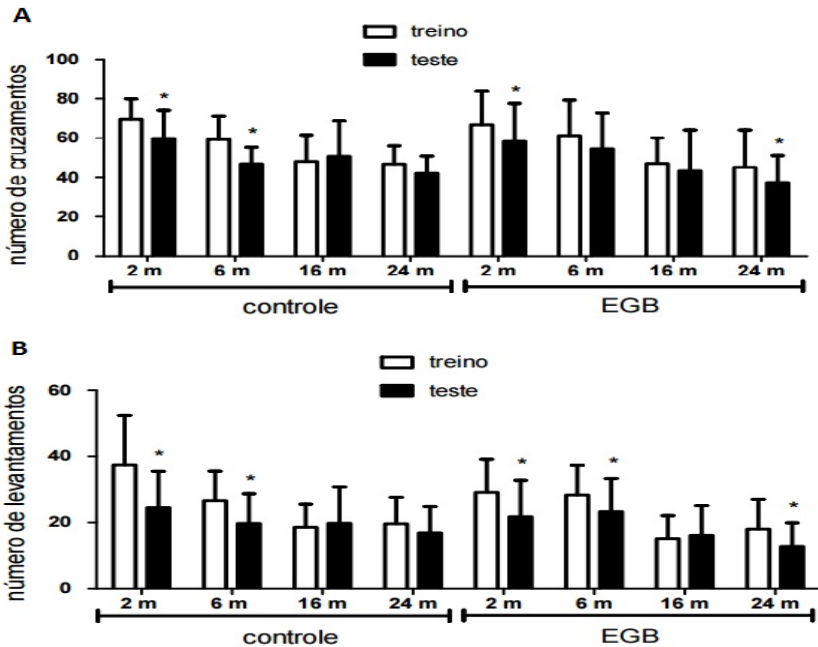


Figura 3 - Efeito do envelhecimento e do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) no teste de memória de habituação ao campo aberto.

Foi observado o número de cruzamentos (A) e o número de levantamentos (B) no teste de memória de habituação ao campo aberto realizados em ratos Wistar com 2, 6, 16 e 24 meses (m) e/ou tratados com *Ginkgo biloba* (100 mg/kg) durante 30 dias. Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média, $n = 8-10$. * $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo na sessão treino.

Fonte: elaborado pelo autor (2015).

A figura 3 B mostra o resultado do teste de habituação ao campo aberto quanto ao número de levantamentos. Foi observado que os animais com 2 e 6 meses reconheceram o ambiente novo após a segunda exposição ao campo aberto, ou seja, não apresentaram dano na memória de habituação. Entretanto, animais com 16 e 24 meses apresentaram dano na memória de habituação. Estes resultados foram semelhantes aos resultados apresentados quanto aos cruzamentos. Em animais com 24 meses o tratamento com EGB durante 30 dias foi capaz de reverter o dano causado pelo envelhecimento, contudo, isso não ocorreu em animais com 16 meses, em que o EGB não conseguiu reverter o dano na memória de habituação causado pelo progressão do processo de envelhecimento.

4.2 MEMÓRIA AVERSIVA NA ESQUIVA INIBITÓRIA

A Figura 4 mostra os resultados da avaliação da memória aversiva através da tarefa de esQUIVA inibitória.

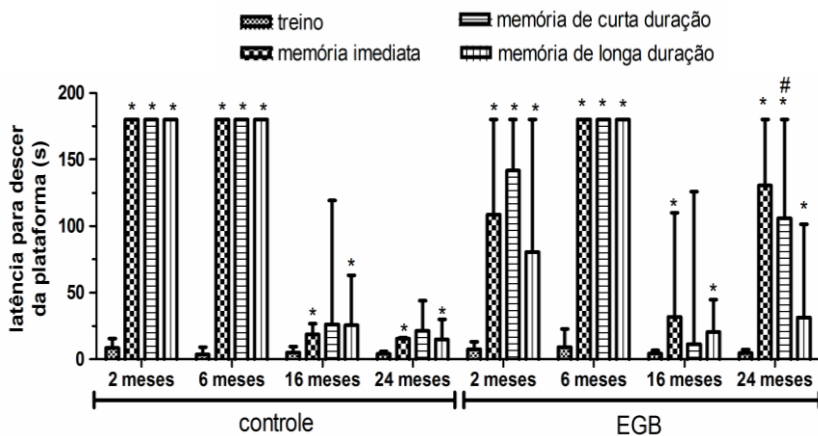


Figura 4 - Efeito do envelhecimento e do extrato de *Gingko biloba* (EGB) no teste de memória aversiva avaliado na esQUIVA inibitória.

Foi observado o tempo de latência do animal para descer da plataforma. Os dados estão representados como a mediana \pm intervalo interquartil, $n= 6-10$. * $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo na sessão treino.

Fonte: elaborado pelo autor (2015).

Nessa tarefa, os ratos do grupo controle de animais com 2 e 6 meses de idade exibiram aumento da latência para a descida da plataforma quando expostos à sessão teste (após a sessão treino em que o rato

recebeu um choque) para a memória imediata (sessão teste 5 s após sessão treino), memória de curta duração (sessão teste 1,5 h após sessão treino) e memória de longa duração (sessão teste 24 h após sessão treino). Os ratos com 16 e 24 meses, no geral, aprenderam menos que os animais com 2 e 6 meses de idade. Além disso, estes animais velhos não aprenderam no teste de esquiwa para a memória de curta duração. O tratamento crônico com EGB, manteve a memória intacta em animais com 2 e 6 meses de idade, mas não reverteu o dano provocado na memória de curta duração em animais com 16 meses de idade. Em animais com 24 meses, o EGB foi capaz de reverter o dano na memória de curta duração.

4.3 NÍVEIS DE BDNF EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO

A figura 5 mostra os níveis de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos com 2, 6, 16 e 24 meses tratados com água ou EGB durante 30 dias. Os resultados mostram que houve aumento dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal de ratos com 6 e 24 meses de idade tratados com EGB. No hipocampo, apenas houve aumento dos níveis de BDNF em ratos com 24 meses tratados com EGB.

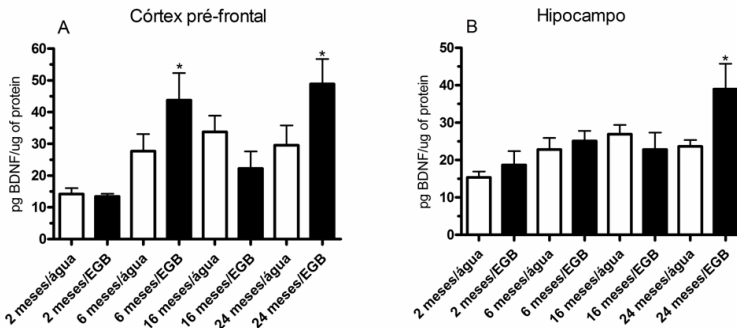


Figura 5 - Efeito do envelhecimento e do extrato de *Gingko biloba* (EGB) nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistar.

Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média, $n = 4-6$. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (2 meses/água).

Fonte: elaborado pelo autor (2015).

4.4 NÍVEIS DE NGF EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO

A figura 6 mostra os níveis de NGF no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos com 2, 6, 16 e 24 meses tratados com água ou EGB durante 30 dias. Os resultados mostram que houve aumento dos níveis de NGF no córtex pré-frontal de ratos com 16 meses de idade tratados com água ou EGB. No hipocampo, apenas houve aumento dos níveis de NGF em ratos com 6 meses tratados com EGB.

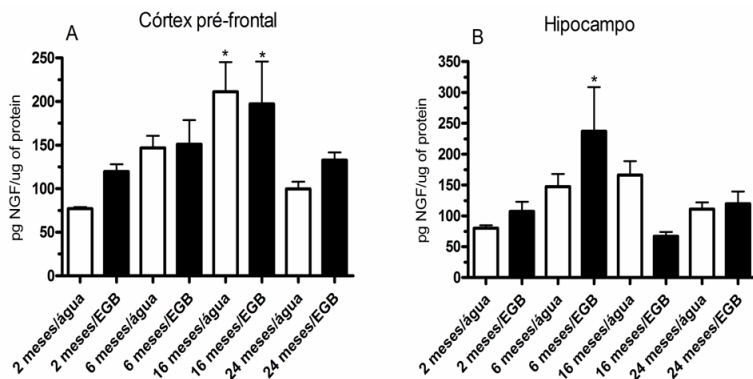


Figura 6 - Efeito do envelhecimento e do extrato de Ginkgo biloba (EGB) nos níveis de NGF no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistar.

Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (2 meses/água).

Fonte: elaborado pelo autor (2015).

4.5 NÍVEIS DE GDNF EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO

A figura 7 mostra os níveis de GDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos com 2, 6, 16 e 24 meses tratados com água ou EGB durante 30 dias. Os resultados mostram que houve aumento dos níveis de GDNF no córtex pré-frontal de ratos com 6 meses de idade tratados com água. Também houve aumento dos níveis de GDNF no córtex pré-frontal de animais com 16 meses e tratados com água ou EGB. No hipocampo, não houve alteração dos níveis de GDNF em nenhum dos grupos experimentais.

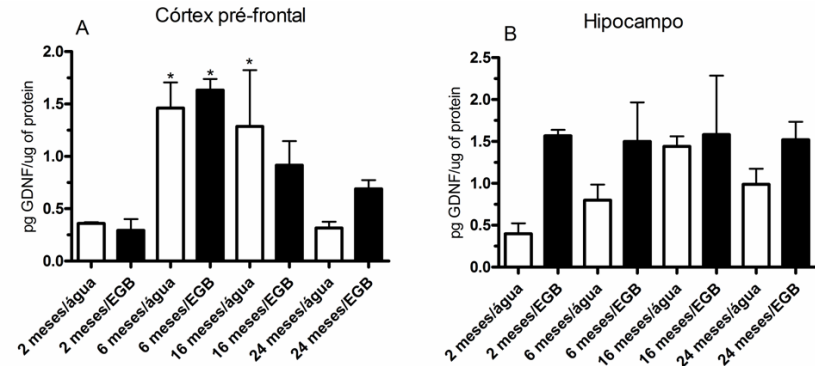


Figura 7 - Efeito do envelhecimento e do extrato de *Gingko biloba* (EGB) nos níveis de GDNF no córtex pré-frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistar.

Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média, $n = 4-6$. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (2 meses/água).

Fonte: elaborado pelo autor (2015).

5 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo foi observado que animais com idade de 2 e 6 meses mantiveram suas memórias de habituação preservadas, já o mesmo não ocorreu com os animais de 16 e 24 meses, que vieram a apresentar dano na memória de habituação. Com a administração de EGb durante 30 dias na dose de 100mg/kg, foi possível alcançar a reversão do referido dano, porém, isso foi observado apenas nos animais com idade de 24 meses. Um perfil semelhante foi encontrado nos resultados da tarefa de esquiiva inibitória. Animais com 16 e 24 meses apresentaram dano cognitivo, uma vez que aprenderam menos quando comparado com ratos de 2 e 6 meses de idade. Ratos com 16 e 24 meses apresentaram dano grave na memória de curta duração e o tratamento com EGb reverteu o dano somente em ratos com 24 meses. Sendo assim, os resultados desse estudo indicam que a dose de 100mg/kg de EGb pode favorecer o índice de melhora nos parâmetros de memória em ratos com 24 meses de idade.

Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura, os quais indicam um efeito neuroprotetor da planta, bem como, a melhora no aprendizado de ratos e camundongos de ambos os sexos (Barkats et al., 1995; Stoll et al., 1996; Cohen-Salmon et al., 1997; Wang et al., 2006; Blecharz-Klin et al., 2009; Belviranli e Okudan, 2015). No entanto, os trabalhos que avaliam o efeito do EGb na memória de habituação e esquiiva inibitória em ratos jovens e idosos, são escassos. Blechartz-Klin et al (2009) em seu estudo, demonstrou que a administração do EGb nas doses de 50, 100 e 150mg/kg junto à água de beber no período de 3 meses, apresenta reversão de danos cognitivos resultantes do envelhecimento em ratos com idade de 18 meses. Em outro estudo, Belvirandi e Okudan (2015) apontam o efeito do EGb na reversão de dano cognitivo no labirinto de morris, fazendo o uso da dose de 100mg/kg durante 30 dias em ratas jovens e idosas, com idades de 3 e 18 meses, respectivamente. Portanto, os resultados do presente estudo confirmam que o EGb pode reverter o dano causado pelo envelhecimento em ratos Wistar com 24 meses. As diferenças existentes entre os estudos relatados na literatura, podem estar relacionadas com as diferenças experimentais entre os laboratórios de estudo, como por exemplo: linhagens de animais que foram utilizados, diferentes testes comportamentais e sexos, bem como, diferentes protocolos utilizados nos diferentes estudos.

O EGb apresenta muitos flavonóides em sua constituição (van Beek., 2002). Estes flavonóides tem efeito antioxidante importante, podendo

ser um dos responsáveis pelo efeito protetor do EGb (Liu et al., 2015). Entretanto, a eficácia destes antioxidantes depende de suas concentrações plasmáticas no indivíduo em que foi administrado, ou seja, se o indivíduo apresentar baixos níveis destes flavonóides na corrente sanguínea, em função do envelhecimento, a administração dos mesmos levará a um possível efeito antioxidante maior. No entanto, na presença adequada de concentrações desses flavonóides, o efeito protetor poderá não ocorrer, ou contrariamente apresentar um efeito tóxico quando administrado (Cerqueira et al., 2015). Isso poderia estar relacionado com a reversão do dano cognitivo em animais mais velhos (24 meses), já que normalmente possuem níveis reduzidos de antioxidantes devido ao processo de envelhecimento normal. Assim sendo, o fato de não ter ocorrido reversão dos danos nos animais com 16 meses de idade, pode estar relacionado à ausência de deficiência de antioxidantes. Segundo Cohen-Salmon et al. (1997), é possível encontrar diferentes respostas do EGb na função cognitiva em diferentes idades e linhagens de animais. Logo, de acordo com os resultados do presente estudo, parece que o EGb pode ter efeitos benéficos dependendo da idade, ou seja, parece que em ratos adultos (2 e 6 meses) que não apresentam dano cognitivo, o tratamento prolongado (crônico) com EGb também não causa dano. Indicando segurança na sua administração crônica. Contudo, a resposta protetora do EGb foi dependente da idade, ou seja, este efeito protetor foi observado em animais com 24 meses e não em animais com 16 meses de idade.

Os flavonóides, presentes no EGb, parecem ter um papel muito importante na neuroproteção (van Beek, 2002; Liu et al., 2015). Foi demonstrado no estudo de Fang et al. (2015) que a combinação de flavonóides do EGb é importante para a prevenção e tratamento de roedores submetidos a um modelo animal da doença de Alzheimer. Estes resultados indicam que a ação neuroprotetora e neuromoduladora dos flavonóides, pode estar relacionada ao fato de que os mesmos atravessam a barreira hematoencefálica, podendo ser eficazes na síntese de fatores neurotróficos, tais como, BDNF e NGF no hipocampo e córtex pré-frontal (Pan et al., 1999a; 1999b). Na neurodegeneração e neuroinflamação relacionada com o declínio da idade, os flavonóides, quando encontrados em baixas concentrações no organismo, são as substâncias mais indicadas para serem suplementadas, visto que exercem efeito benéfico no cérebro (Peluso e Palmery, 2015). Em particular, estas interações incluem a capacidade de ativar vias de sinalização, responsáveis pelo controle da plasticidade sináptica e um potencial para induzir efeitos vasculares capazes de causar o

crescimento de células nervosas no hipocampo (Shif et al., 2006).

No presente estudo também foram analisados os níveis de fatores neurotróficos no cérebro de animais com 2, 6, 16 ou 24 meses. Os resultados desse estudo apresentam evidências de que houve aumento dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal de ratos com 6 e 24 meses de idade submetidos ao tratamento com EGb, o mesmo ocorreu no hipocampo apenas de animais com 24 meses. O efeito protetor do EGb pode estar relacionado ao aumento dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo, uma vez que o BDNF é uma importante proteína para eventos plásticos relacionados à manutenção da memória (Bekinschtein et al., 2007, Faria et al., 2013). A expressão aumentada de BDNF foi confirmada em um estudo realizado no hipocampo de camundongos transgênicos que receberam a administração de flavonóides e, este efeito, pode ser correlacionado com os comportamentos de melhora cognitiva em camundongos (Hou et al., 2010).

Na memória de longo prazo ocorrem as sínteses de novas proteínas que ativam uma cascata de sinalização celular levando a alteração da plasticidade neuronal, relacionados diretamente com a persistência de memória, principal característica da memória de longa duração. Essa persistência, por sua vez, pode ser dependente da ativação da via de sinalização intracelular envolvendo AMPc/MAPK/CREB no hipocampo. Essa consideração relaciona-se com evidências de que repetidos ciclos de síntese do receptor de glutamato do tipo N-metil-D-Aspartato (NMDA) seriam requeridos para consolidação da memória e sua manutenção (Cui et al 2004). A ativação desta cascata envolve a ligação do BDNF ao seu receptor TrkB, um receptor tirosinaquinase (Zheng et al., 2012; Calabrese et al., 2014). Esse mecanismo explicaria o efeito protetor do EGb nos animais com 24 meses de idade que fizeram parte do presente estudo. Estudos já relataram que EGb 761 aumenta a neurogênese e restaura a fosforilação de CREB e expressão do BDNF em células de neuroblastoma do hipocampo (Tchantchou et al., 2007; Xu et al, 2007). Estes dados sugerem que os flavonóides que constituem EGb 761, podem regular a via de sinalização CREB-BDNF.

Além do EGb aumentar os níveis de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos com 24 meses de idade, também induziu aumento nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal de animais com 6 meses e tratados com EGb. Esse efeito, porém, ocorreu somente no córtex, podendo assim estar ou não relacionado ao fato de não causar qualquer efeito ao nível de dano cognitivo, já que estes animais não apresentaram dano na memória de habituação ao campo aberto.

Foram observados níveis elevados de NGF no hipocampo dos animais que receberam 100 mg/kg de EGb. O EGb, nesta idade, não induziu dano cognitivo, visto que nem mesmo os animais tratados com água apresentaram dano na memória de habituação. Também os animais com 16 meses, independente do tratamento, tiveram os níveis de NGF aumentados. Nesta idade o EGb não conseguiu reverter o dano cognitivo induzido pelo processo de envelhecimento.. Em um estudo realizado por Xu et al. (2012), um flavonóide isolado do EGb potencializou o aumento de NGF e induziu o crescimento de neuritos em células PC12 em meio de cultura. Os níveis de NGF encontrados aumentados nesse estudo podem ser de pró-NGF, pois o ELISA sanduíche não distingue entre NGF maduro e pró-GF (Ebendal et al., 1989). O NGF sinaliza para a sobrevivência celular (Cuello, 2012; Bradshaw et al., 2015) enquanto o pró-NGF para a morte celular por apoptose (Nykjaer et al., 2004; Perovic et al., 2013; Bradshaw et al., 2015). Zhao et al. (2012) mostrou que o EGb pode melhorar a memória e a capacidade de aprendizagem de ratos diabéticos e, este mecanismo, pode ser atribuído ao aumento da expressão de NGF, neurotrofina-3 (NT-3) e a redução da apoptose em neurônios do hipocampo. O nível aumentado de NGF em animais com 16 meses tratados ou não com o EGb, pode explicar o fato de o mesmo não ter revertido o dano na memória de habituação. No caso do aumento de NGF no córtex pré-frontal de animais com 16 meses pode justificar o dano provocado pelo envelhecimento e o EGb não foi capaz de reverter este dano. Contudo, animais com 16 meses podem ter ativação dos receptores p75NTR, contribuindo, dessa forma, para a ocorrência do dano na memória de habituação e, talvez, seja esse o motivo pelo qual não houve a reversão. Entretanto, estudos adicionais são necessários para a confirmação desta hipótese.

Os níveis de GDNF foram aumentados apenas no córtex pré-frontal nos animais com 6 meses tratados com água e nos animais com 16 meses tratados com água e EGb. Não há, na literatura atual, estudo correlacionando o EGb com os níveis de GDNF. Mesmo no envelhecimento, o número de trabalhos relacionados com GDNF é escasso. Fox et al. (2001) mostrou que o GDNF pode proteger neurônios dopaminérgicos contra o efeito da 6-hidroxidopamina em ratos jovens e idosos. Além disso, outro estudo mostrou que o GDNF pode estar em níveis elevados na medula espinhal de ratos idosos (24 meses) submetidos a 2 semanas de exercício físico (McCullough et al., 2013). O aumento de GDNF parece estar envolvido com o processo de neuroproteção, porém, esse efeito protetor não foi observado nesse trabalho nem mesmo com o aumento dos níveis de GDNF em animais

com 16 meses com ou sem tratamento com EGb e a ocorrência de dano na memória de habituação ao novo ambiente. Portanto, estudos adicionais devem ser realizados para elucidar este efeito.

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o EGb reverteu o dano cognitivo induzido pelo envelhecimento em ratos com 24 meses de idade. Parece que este efeito pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo aumento dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos idosos. Além disso, foi observado que em animais adultos (2 e 6 meses) o EGb não causou dano cognitivo. Contudo, adicionais estudos devem ser realizados para elucidar o mecanismo de ação do EGb em ratos adultos e idosos.

REFERÊNCIAS

- Ahmed AO, Mantini AM, Fridberg DJ, Buckley PF. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurocognitive deficits in people with schizophrenia: A meta-analysis. *Psychiatry Res.* 2015;226(1):1-13.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 2013;138:155-75.
- Al-Shawi R, Hafner A, Olsen J, Chun S, Raza S, Thrasivoulou C, et al. Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. *Eur J Neurosci.* 2008;27(8):2103-14.
- Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibanez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron.* 1995;15(6):1465-73.
- Baloh RH, Tansey MG, Golden JP, Creedon DJ, Heuckeroth RO, Keck CL, et al. TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron.* 1997;18(5):793-802.
- Barkats M, Venault P, Christen Y, Cohen-Salmon C. Effect of long-term treatment with EGb 761 on age-dependent structural changes in the hippocampi of three inbred mouse strains. *Life Sci.* 1995;56:213-22.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron.* 2007;53(2):261-77.
- Belviranlı M, Okudan N. The effects of Ginkgo biloba extract on cognitive functions in aged female rats: the role of oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor. *Behav Brain Res.* 2015;278:453-61.
- Birks J, Grimley Evans J. Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia (Review) Copyright © 2009 The Cochrane Collaboration. Published by JohnWiley & Sons, Ltd.
- Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neuronal mechanisms of ageing and

cognitive decline. *Nat.* 2010;464:529-35.

Blesharz-Klim K, et al. Pharmacological and biochemical effects of Ginkgo biloba extract on learning, memory consolidation and motor activity in old rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2009;69:217-31.

Blesch A, Grill RJ, Tuszynski MH. Neurotrophin gene therapy in CNS models of trauma and degeneration. *Prog Brain Res.* 1998;117:473-84.

Borba LO, Guimarães AN, Mazza VA, Maftum MA. Mental health care based on the psychosocial model: reports of relatives and persons with mental disorders. *Rev Esc Enferm USP.* 2012;46:1406-14.

Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, Chalkley RJ, Burlingame AL, Hondermarck H. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Adv Biol Regul.* 2015;58:16-27.

Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* 2015;6(5):331-41

Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G, Gass P, Riva MA, Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci.* 2014;22(8):430.

Cefalu C A. Theories and mechanisms of aging. *Clin Geriatr Med.* 2011;27(4):491-506.

Chao CC, Lee EH. Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor on dopamine neurons: role of antioxidation. *Neuropharmacology.* 1999;38(6):913-6.

Chao MV, Hempstead BL. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 1995;18(7):321-6.

Cheng H, Fu YS, Guo JW. Ability of GDNF to diminish free radical production leads to protection against kainate-induced excitotoxicity in hippocampus. *Hippocampus.* 2004;14(1):77-86.

Cohen-Salmon C, Venault P, Martin B, Raffalli-Séville MJ, Barkats

M, Clostre F, Pardon MC, Christen Y, Chapouthier G. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on learning and possible actions on aging. *J Physiol Paris*. 1997;91:291-300.

Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol*. 2010;3(1):12-29.

Cuello AC. Gangliosides, NGF, brain aging and disease: a mini-review with personal reflections. *Neurochem Res*. 2012;37:1256-60

Cui Z, Wang H, Tan Y, Zaia KA, Zhang S, Tsien JZ. Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial roles of the NMDA receptor preserving in remote memories in the brain. *Neuron* 2004;41:781-93.

Curtis-Prior P, Vere D, Fray P. Therapeutic Value of Ginkgo biloba in Reducing Symptoms of Decline in Mental Function. *J. Pharm. Pharmacol* 1999;51:12-14

Deister C, Schmidt CE. Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth. *J Neural Eng*. 2006;3(2):172-9.

Ebendal T, Persson H, Larhammar D, Lundströmer K, Olson L. Characterization of antibodies to synthetic nerve growth factor (NGF) and proNGF peptides. *J Neurosci Res*. 1989;22:223-40.

Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, et al. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem*. 2001;276(35):32687-95.

Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*. 2001;18(2):210-20.

Fang X, Jiang Y, Ji H, Zhao L, Xiao W, Wang Z, Ding G. The Synergistic Beneficial Effects of Ginkgo Flavonoid and Coriolus versicolor Polysaccharide for Memory Improvements in a Mouse Model of Dementia. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:128394.

Faria RS, Sartori CR, Canova F, Ferrari EA. Classical aversive conditioning induces increased expression of mature-BDNF in the hippocampus and amygdala of pigeons. *Neuroscience*. 2013;255:122-33.

Farrand AQ, Gregory RA, Scofield MD, Helke KL, Boger HA. Effects of aging on glutamate neurotransmission in the substantia nigra of Gdnf heterozygous mice. *Neurobiol Aging*. 2015;36(3):1569-76.

Fox CM, Gash DM, Smoot MK, Cass WA. Neuroprotective effects of GDNF against 6-OHDA in young and aged rats. *Brain Res*. 2001;896(1-2):56-63.

Fuchikami M, Morinobu S, Kurata A, Yamamoto S, Yamawaki S. Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009;12(1):73-82.

Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med*. 2003;9(5):589-95.

Guan H, Qian D, Ren H, Zhang W, Nie H, Shang E, Duan J. Interactions of pharmacokinetic profile of different parts from Ginkgo biloba extract in rats. *J Ethnopharmacol*. 2014;155:758-68.

Guo J, Wang J, Liang C, Yan J, Wang Y, Liu G, et al. proNGF inhibits proliferation and oligodendrogenesis of postnatal hippocampal neural stem/progenitor cells through p75NTR in vitro. *Stem Cell Res*. 2013;11(2):874-87.

Hara Y, Morrison JH, Ten C. Synaptic Correlates of Aging and Cognitive Decline. *The Synapse Structure and Function*. 2014;19: 301-42.

Hasenohrl RU, Soderstrom S, Mohammed AH, Ebendal T, Huston JP. Reciprocal changes in expression of mRNA for nerve growth factor and its receptors TrkA and LNGFR in brain of aged rats in relation to maze learning deficits. *Exp Brain Res*. 1997;114(2):205-13.

Hibbert AP, Kramer BMR, Miller FD, Kaplan DR. The localization, trafficking and retrograde transport of BDNF bound to p75NTR in sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci*. 2006;32(4):387-402.

Honda H. Ginkgos and insects. In: Hori T, Ridge RW, Tulecke W, Del Tredici P, Tremouillaux-Guiller J, Tobe H, editors. *Ginkgo Biloba-A Global Treasure*. Tokyo: Springer-Verlag; 1997. p. 243–50.

Hou Y, Aboukhatwa MA, Lei DL, Manaye K, Khan I, Luo Y. Antidepressant Natural Flavonols Modulate BDNF and Beta Amyloid in Neurons and Hippocampus of Double TgAD Mice. *Neuroph*. 2010;58:911–920.

Isah T. Rethinking Ginkgo biloba L.: Medicinal uses and conservation *Pharmacogn. Rev*. 2015;9(18):140-148.

Islam O, Loo TX, Heese K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways. *Curr Neurovasc Res*. 2009;6(1):42-53.

Ismail Z, Nguyen MQ, Fischer CE, Schweizer TA, Mulsant BH, Mamo D. Neurobiology of delusions in Alzheimer's disease. *Curr Psychiatry Rep*. 2011;13:211-8.

Jahanshahi M, Nickmahzar EG, Babakordi F. The effect of Ginkgo biloba extract on scopolamine-induced apoptosis in the hippocampus of rats. *Anat Sci Int*. 2013;88: 217-222

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(4):368-76.

Jeckel-Neto EA, Cunha GL. Teorias Biológicas do Envelhecimento. In: Freitas EV et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.13-22.

Korsching S, Auburger G, Heumann R, Scott J, Thoenen H. Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *Embo J*. 1985;4(6):1389-93.

Larkfors L, Ebendal T, Whittemore SR, Persson H, Hoffer B, Olson L.

Decreased level of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in the aged rat brain. *Brain Res.* 1987;427(1):55-60.

Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res.* 2015;1621:82-101.

Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001;294:1945-1948.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 1993;260(5111):1130-2.

Liu XG, Wu SQ, Li P, Yang H. Advancement in the chemical analysis and quality control of flavonoid in Ginkgo biloba. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;14:S0731-7085(15)00174-0.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.

McCullough MJ, Gyorkos AM, Spitsbergen JM. Short-term exercise increases GDNF protein levels in the spinal cord of young and old rats. *Neuroscience.* 2013;240:258-68.

Matsunaga W, Isobe K, Shirokawa T. Involvement of neurotrophic factors in aging of noradrenergic innervations in hippocampus and frontal cortex. *Neurosci Res.* 2006;54(4):313-8.

Mattson MP, Duan W, Chan SL, Cheng A, Haughey N, Gary DS, Guo Z, Lee J, Furukawa K. Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behavior. *Neurobiol Aging.* 2002;23:695-705.

Middleton E Jr, Anne S. Quercetin inhibits lipopolysaccharide-induced expression of endothelial cell intracellular adhesion molecule-1. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107:435-6.

Mohanta T K. Advances in Ginkgo biloba research: Genomics and metabolomics perspectives. *African J Biotechnol.* 2012;11:15936-44.

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic

factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;63(1):71-124.

Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV Jr, Yang J, Hempstead BL, Lu B. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2009;106:1267–1272.

Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, Petersen CM. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature.* 2004;427:843-8.

Pacala JT, Sullivan Gm. Geriatric review syllabus: a core curriculum in geriatric medicine. 7th edition. New York: American Geriatrics Society; 2010. p. 9–14.

Pan Y, Anthony M, Clarkson TB. Effect of estradiol and soy phytoestrogens on choline acetyltransferase and nerve growth factor mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of female rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999a;221:118-25.

Pan Y, Anthony M, Clarkson TB. Evidence for up-regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA by soy phytoestrogens in the frontal cortex of retired breeder female rats. *Neurosci Lett.* 1999b;261:17-20.

Pang PT, Lu B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res. Rev.* 2004;3:407-430.

Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. Cleavage of pro BDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science.* 2004;306:487–491.

Peluso I, Palmery M. Flavonoids at the pharma-nutrition interface: Is a therapeutic index in demand? *Biomed Pharmacother.* 2015;71:102-107.

Perovic M, Tesic V, Mladenovic Djordjevic A, Smiljanic K, Loncarevic-Vasiljkovic N, Ruzdijic S, Kanazir S. BDNF transcripts, proBDNF and proNGF, in the cortex and hippocampus throughout the life span of the rat. *Age.* 2013;35:2057-70

Pertusa M, Garcia-Matas S, Mammeri H, Adell A, Rodrigo T, Mallet J, et al. Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats. *Neurobiol Aging*. 2008;29(9):1366-79.

Sakatani K, Tanida M, Hirao N, Takemura N. Ginkgo biloba extract improves working memory performance in middle-aged women: role of asymmetry of prefrontal cortex activity during a working memory task. *Adv Exp Med Biol*. 2014;812:295-301.

Shif O, Gillette K, Damkaoutis CM, Carrano C, Robbins SJ, Hoffman JR. Effects of Ginkgo biloba administered after spatial learning on water maze and radial arm maze performance in young adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;84:17-25.

Silhol M, Arancibia S, Perrin D, Maurice T, Alliot J, Tapia-Arancibia L. Effect of aging on brain-derived neurotrophic factor, proBDNF, and their receptors in the hippocampus of Lou/C rats. *Rejuvenation Res*. 2008;11(6):1031-40.

Sinclair WA, Lyon HH, Johnson WT. *Diseases of Trees and Shrubs*. Cornstock Publishing Associates Ithaca. 1987:575.

Singh B, Kaur P, Gopichand, Singh RD, Ahuja PS. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia*. 2008;79:401-18.

Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, Gash DM, Kryscio R, Young B. Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminial infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg*. 2005;102(2):216-22.

Stoll S, Scheuer K, Pohl O, Müller WE. Ginkgo biloba extract (EGb 761) independently improves changes in passive avoidance learning and brain membrane fluidity in the aging mouse. *Pharmacopsychiatry*. 1996Jul;29:144-9.

Tan MS, Yu JT, Tan CC, Wang HF, Meng XF, Wang C, Jiang T, Zhu XC, Tan L. Efficacy and Adverse Effects of Ginkgo Biloba for Cognitive Impairment and Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*. 2015;43(2):589-603.

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev.* 2008;59(1):201-20.

Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25(2):77-107.

Tchantchou F1, Xu Y, Wu Y, Christen Y, Luo Y. EGb 761 enhances adult hippocampal neurogenesis and phosphorylation of CREB in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Faseb J.* 2007;21:2400-8.

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* 2005;25(22):5455-63.

Terry AV, Jr., Kutiyawalla A, Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol Behav.* 2011;102(2):149-57.

Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, et al. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature.* 1996;381(6585):785-9.

Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem.* 2002;9(5):224-37.

van Beek TA, Montoro P. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts. *J Chromatogr A.* 2009 Mar 13;1216(11):2002-32.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000;7:333-40.

Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J. The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. *Br J Pharmacol.* 2006;148:147-53.

Wang YJ, Valadares D, Sun Y, Wang X, Zhong JH, Liu XH, et al. Effects of proNGF on neuronal viability, neurite growth and amyloid-beta metabolism. *Neurotox Res.* 2010;17(3):257-67.

World Health Organization. World report on ageing and health. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2015;43-51.

Xu Y, Cui C, Pang C, Christen Y, Luo Y. Restoration of impaired phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) by EGb 761 and its constituents in Abeta-expressing neuroblastoma cells. *Eur J Neurosci.* 2007;26:2931-9.

Xu SL, Choi RC, Zhu KY, Leung KW, Guo AJ, Bi D, Xu H, Lau DT, Dong TT, Tsim KW. Isorhamnetin, a Flavonol Aglycone from *Ginkgo biloba* L., Induces Neuronal Differentiation of Cultured PC12 Cells: Potentiating the Effect of Nerve Growth Factor. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:278-3.

Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience.* 1997;78(2):431-48.

Yang C, Liu Y, Ni X, Li N, Zhang B, Fang X. Enhancement of the nonamyloidogenic pathway by exogenous NGF in an Alzheimer transgenic mouse model. *Neuropeptides.* 2014;48(4):233-8.

Zasshi Y. Analysis of Aging-related oxidative stress status in normal aging animals and development of anti-aging interventions. *Yakugaku Zasshi* 2010;130:29-42.

Zhang Y, Zhang Y, Chen M, Zhou Y, Lang M. Galactosylated poly(ϵ -caprolactone) membrane promoted liver-specific functions of HepG2 cells in vitro. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;1:52-8.

Zhao J, Jin KK, Wu L, Chen GR, Li JM. Effects of extract of *Ginkgo biloba* on learning and memory ability and NGF and NT-3 expression in diabetic rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.* 2012;28(5):467-71.

Zheng F, Zhou X, Moon C, Wang H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2012;4:188-200.

Zheng SX, Zhou LJ, Chen ZL, Yin ML, Zhu XZ. Bilobalide promotes expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growthfactor in rat astrocytes. *Acta Pharmacol Sin.* 2000;21:151-5.

Zurn AD, Winkel L, Menoud A, Djabali K, Aebischer P. Combined effects of GDNF, BDNF, and CNTF on motoneuron differentiation in vitro. *J Neurosci Res.* 1996;44(2):133-41.

ANEXO

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 074-2014-02

Professor responsável: Josiane Budni

Equipe: Vanessa Moraes de Andrade, Jesiel de Medeiros, Gustavo Luis Schiavo, Mauricio Lopes da Silva, Rafael Bis Dalponte de Sá, Sabrina da Silva, Franciele Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Ricardo Chiengo Sapalo Cassoma, Erico Pigozzi Cassaro, Bruna Luiza Claudiano Voss, Edson Rodrigues Garcia Filho, Guilherme Fretta Ramos, Ludmila de Abreu Castro, Amanda Barcellos

Título: "Efeito do tratamento com *Ginkgo biloba* na memória e parâmetros bioquímicos em ratos Wistar com 2, 6, 12 e 24 meses de idade."

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 240 Ratos Wistar, com 2, 6, 12 e 24 meses, pesando aproximadamente 350 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 074-2014-02

Principal Investigator: Josiane Budni

Researchers: Vanessa Moraes de Andrade, Jesiel de Medeiros, Gustavo Luis Schiavo, Mauricio Lopes da Silva, Rafael Bis Dalponte de Sá, Sabrina da Silva, Franciele Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Ricardo Chiengo Sapalo Cassoma, Erico Pigozzi Cassaro, Bruna Luiza Claudiano Voss, Edson Rodrigues Garcia Filho, Guilherme Fretta Ramos, Ludmila de Abreu Castro, Amanda Barcellos

Project title: "Effect of *Ginkgo biloba* treatment on memory and biochemical parameters in Wistar rats with 2, 6, 12 and 24 months old."

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 16 de dezembro de 2014.

JAIRO JOSÉ ZOCHE
Coordenador da CEUA