

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

RYCHARD ARRUDA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA
DE NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM MODELO DE
TAUPATIA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciências da Saúde
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre
Pastoris Muller

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S729a Souza, Rychard Arruda de.

Avaliação dos efeitos da administração crônica de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em modelo de taupatia em ratos / Rychard Arruda de Souza. - 2017.

86 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Alexandre Pastoris Muller.

1. Nanopartículas de ouro – Uso terapêutico. 2. Taupatias – Tratamento. 3. Demência – Tratamento. 4. Sistema nervoso – Degeneração. 5. Neuroinflamação. 6. Estresse oxidativo. 7. Memória espacial. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1



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 Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pelo candidato **Rychar** **Arruda de Souza** sob o título “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM MODELO DE TAUPATIA EM RATOS**”, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação.

Críciúma, SC, 18 de abril de 2017.


Prof.ª **Dra. JOSIANE BUDNI**
Membro Relator


Prof. Dr. **RICARDO AUGUSTO DE PINHO**
Membro Interno


Prof.ª **Dra. GISLAINE TEZZA REZIN**
Membro Externo


Prof. Dr. **Alexandre Pastoris Müller**
Orientador


Prof.ª **Dra. Maria Inês da Rosa**
Coordenadora do PPGCS

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 Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

“Insanidade pode ser definida por repetir sempre a mesma coisa e esperar resultados diferentes”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela vida, pela família, pelas oportunidades e pelos caminhos nos quais tem me guiado.

Agradeço, carinhosamente, à Gabrielly, minha querida esposa, por estar sempre comigo, por acreditar em mim e fazer parte dos meus projetos. Por ser minha parceira, neste programa, acompanhando-me pelos dias e noites de intenso estudo para que pudesse concluir o curso de mestrado em tempo hábil. Agradeço-lhe, também, por ser a mãe dedicada e amorosa para os nossos amados filhos, Gabriel e Valentina.

Aos meus pais, pela forma de criação que me fez o que sou, ensinando-me a valorizar e a cultivar as virtudes que me fazem ser um ser humano melhor.

À Dra. Elisa Franco de Assis Costa, obrigado pelo incentivo tanto nos estudos quanto no desenvolvimento pessoal..

Ao meu respeitado orientador, Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller, sou-lhe, imensamente, grato pela paciência e empenho e, também, por compartilhar ideias e conhecimentos, estimulando, sempre, o crescimento acadêmico.

Agradeço, profundamente, aos componentes do LAFIBE, em especial, à Sabrina da Silva, por ter me ajudado na fase final do meu trabalho e, também, aos doutores, doutorandos, mestrandos por terem me acolhido tão bem e por contribuírem, direta ou indiretamente, com meu crescimento científico e profissional. Aos acadêmicos da iniciação científica, agradeço pelo convívio, dedicação e trabalho incansável no laboratório para a execução da pesquisa. Muito obrigado, pois, sem a colaboração de vocês isso tudo não seria possível.

Meu muito obrigado aos professores do PPGCS, pelos valiosos ensinamentos ao longo do mestrado.

Obrigado aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

E, por fim, sinceros agradecimentos à Unesc, à UniRV e à CAPES por oportunizar a concretização do Mestrado

RESUMO

As Taupatias estão envolvidas em uma série de doenças, incluindo as neurodegenerativas. Atualmente, as intervenções terapêuticas para diversos tipos de demência não são efetivas. Sendo assim, tratamentos direcionados para estágios iniciais da neurodegeneração são necessários, na tentativa de modificar o prognóstico destas doenças. Acredita-se que a etiologia da disfunção cognitiva possa estar associada à neuroinflamação e estresse oxidativo, desencadeando a morte de neurônios em regiões associadas à formação da memória. Tendo em vista este aumento significativo das síndromes demenciais, a não existência de fármacos eficazes para controle das mesmas e que as nanopartículas de ouro (GNP) apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória; o objetivo do estudo foi avaliar o efeito do tratamento com GNP em duas doses sobre a cognição e atividade anti e pró-oxidante cerebral, em um modelo de Taupatia. A Taupatia foi induzida através do ácido ocaidaico (AO) injetado por via intracerebroventricular (ICV) na dose de 100ug. O tratamento com GNP nas doses 2,5mg/kg e 5,0mg/kg por via intraperitoneal administrados a cada 48h por 21 dias, iniciou-se 24h após injeção de AO. Os ratos foram divididos nos seguintes grupos: Sham + Salina; Sham + GNP 2,5; Sham + GNP 5,0; AO + Salina; AO + GNP 2,5; AO + GNP 5,0 (n= 15 animais por grupo). Após o tratamento, os animais foram submetidos à avaliação da memória espacial pelo teste de Barnes maze. Após 24h, os animais foram mortos e o córtex pré-frontal, hipocampo e estriado retirados para as análises de parâmetros anti e pro oxidante. Os animais dos grupos AO + Salina e AO + GNP 5,0, apresentaram déficit cognitivo na memória espacial. Os parâmetros antioxidantes no hipocampo (níveis de GSH e sulfidril; atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT)) foram diminuídos pelo AO e a dose de GNP 2,5mg/kg preveniu esse dano. No córtex pré-frontal, os níveis de GSH foram diminuídos pelo AO e a dose de GNP 2,5mg/kg preveniu este efeito. No estriado, a atividade da CAT foi reduzida pelo AO e a dose de GNP 2,5mg/kg preveniu este efeito. Os marcadores pró-oxidantes (nitrito e diclorofluoresceína (DCF)) foram aumentados no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado pelo AO e GNP 2,5mg/kg preveniu este efeito. O imunocontedo de Tau fosforilada foi aumentado por AO e GNP na dose de 2,5mg/kg previniu este efeito em córtex pré- frontal e hipocampo. Tomados em conjunto, os resultados obtidos por este estudo apontam as GNPs como promissoras no tratamento da Taupatia.

Palavras-chave: demência, nanopartículas de ouro, memória espacial e estresse oxidativo.

ABSTRACT

Taupatas are involved in a number of diseases, including neurodegenerative diseases. Currently, therapeutic interventions for various types of dementia are not effective. Therefore, treatments that work in the early stages of neurodegeneration are necessary. The etiology of cognitive dysfunction may be associated with neuroinflammation and oxidative stress (ROS), leading to neurons death in regions associated to memory processing. In view of this significant increase in dementia syndromes and the absence of an effective drug, we tested the gold nanoparticles (GNP) that have antioxidant and anti-inflammatory activity. The purpose of this study was to evaluate the effect of two-doses of GNP treatment on cognition and activity anti and pro-oxidant in a Taupatia model. Taupatia was induced through okadaic acid (AO) intracerebroventricularly injected (ICV) at a dose of 100ug. Treatment with GNP at doses 2.5mg / kg and 5.0mg / kg intraperitoneally administered every 48h for 21 days, started 24h after injection of AO. The rats were divided into the following groups: Sham + Saline; Sham + GNP 2.5; Sham + GNP 5.0; AO + Saline; AO + GNP 2.5; AO + GNP 5.0 (n = 15 animals per group). After treatment, the animals were submitted to spatial memory evaluation by the Barnes maze test. After 24 h the animals were killed and the cortex, hippocampus and striatum removed for biochemistry analysis. The animals of the groups AO + Salina and AO + GNP 5.0 presented cognitive deficit in spatial memory. The antioxidant activity of hippocampus (GSH and sulfhydryl levels, SOD and CAT activity) was decreased by AO and the dose of GNP 2.5mg / kg prevented this damage. In the cortex the levels of GSH were decreased by AO and the dose of GNP 2.5mg / kg prevented this effect. In striatum catalase activity was decreased by AO and the dose of GNP 2.5 mg / kg prevented this effect. Pro-oxidant markers (nitrite and DCF) were increased in cortex, hippocampus and striatum by AO and GNP 2.5mg / kg prevented this effect. The immunocontent of Tau phosphorylation was increased by AO and GNP at dose 2,5mg/kg prevent this effect in both pre- frontal cortex and hippocampus. Taken together, the results pointing to GNP's as promising in the treatment of Taupatia, however further studies should be directed towards a better understanding of the role of GNP in the modulation of the anti and pro-oxidant system.

Key words: dementia, gold nanoparticles, spatial memory and oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama representativo do efeito do AO sob o estresse oxidativo, regulação da atividade das quinases, sob a hiperfosforilação da Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares levando a apoptose.	28
Figura 2 - Percursos de entrada e saída da formação do hipocampo.....	29
Figura 3 - Hipótese da demência associada ao estresse oxidativo, causando dano oxidativo de membranas neuronais e DNA em hipocampo.	33
Figura 4 - Cronograma experimental	40
Figura 5 - A memória espacial foi avaliada pelo teste de Barnes Maze.	46
Figura 6 - Os níveis de GSH foram diminuídos em córtex pré-frontal .	47
Figura 7 - A atividade da SOD.	49
Figura 8 - Atividade da CAT.....	51
Figura 9 - Os níveis de grupamento sulfidrila.	53
Figura 10 - Os níveis de nitrito foram aumentados em córtex pré-frontal	55
Figura 11 - Os níveis de DCF foram aumentados em córtex pré-frontal	57
Figura 12 - Proteína Tau fosforilada (pTau ser 396).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SÍGLAS

AChE – Acetilcolinesterase
ANOVA – Análise de variância simples (do inglês, *analysis of variance*)
AO - Ácido Ocadaico
APOE- Apolipoproteína E
A β – Beta-amilóide (do inglês, *amyloid- β*)
CAT – Catalase
ICV – Intracerebroventricular
SOD - Superóxido Dismutase
CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DA - Doença de Alzheimer
DCFH-DA- 2',7'-Diclorofluoresceína-diacetato (do inglês, 2',7'
Dichlorodihydrofluorescein diacetate)
DNA- Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)
EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do
inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
GNP – Nanopartículas de ouro (do inglês, *Gold nanoparticles*)
GSH – Glutathiona
GSK3- β - Glicogênio cinase 3 (do inglês, *Glycogen Synthase Kinase 3*)
GSSG – Glutathiona Oxidada
H₂O- Água
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HAuCl₄ – Ácido Auroclorídrico
IL- 1 β – Interleucina 1 - beta
IL-6 – Interleucina 6
IP – intraperitoneal
NAD (+) – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina Oxidado
NADPH- Adenosina Nicotinamina Fosfato Oxidase (do inglês,
nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase)
NF- κ B- Fator Nuclear Kappa B (do inglês, Factor Nuclear Kappa B)
NO – Óxido Nítrico (do inglês, *Nitric Oxide*)
PP1/2A – Proteína Fosfatase
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen
species*)
TBARS- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês,
Thiobarbituric Acid Reactive Substances)
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral – alfa (do inglês, *Tumor Necrosis
Factor- Alpha*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	25
1.2 MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA POR TAUPATIA COM ACIDO OCADAICO	26
1.3 FORMAÇÃO DA MEMÓRIA E DEMÊNCIAS.....	28
1.3.1 Hipocampo	29
1.3.2 Córtex pré-frontal	30
1.3.3 Estriado	31
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO NAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	31
1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO	33
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 QUESTÕES ÉTICAS	39
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	39
3.3 CRONOGRAMA EXPERIMENTAL	39
3.4 INDUÇÃO DO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATAMENTO..	40
3.5 TRATAMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	40
3.6 PROTOCOLO DO TESTE COMPORTAMENTAL BARNES MAZE	41
3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	41
3.7.1 Marcadores de Danos Oxidativos e atividade e conteúdo de enzimas antioxidantes	41
3.8 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING	43
3.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	44
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS	45
4.1 EFEITO DO AO E DO TRATAMENTO COM GNP NA MEMÓRIA ESPACIAL AVALIADA PELO TESTE DE BARNES MAZE	45
4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM HIPOCAMPO, CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E ESTRIADO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATADOS COM GNP.....	46
4.2.1 Níveis de GSH	46
4.2.2 Atividade da SOD	48
4.2.3 Atividade da Catalase	50

4.2.4 Níveis de Sulfidrina	52
4.3 ATIVIDADE PRÓ-OXIDANTE EM HIPOCAMPO, CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E ESTRIADO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATADOS COM GNP.....	54
4.3.1 Níveis de nitrito.....	54
4.3.2 Níveis de DCF	56
4.4 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING EM HIPOCAMPO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATADOS COM GNP POR IP.	58
4.4.1 Fosforilação de Tau em córtex e hipocampo.....	58
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	67
7 PERSPECTIVAS	69
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE.....	85
APÊNDICE A - CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

O envelhecimento da população contribuiu para o aumento da prevalência das doenças neurodegenerativas (demências) e estimativas recentes preveem que estas doenças vão afetar mais de 80 milhões de indivíduos em 2040 (Brookmeyer et al., 2011). A demência mais comum é a doença de Alzheimer (DA) (Reisberg, 2006), de acordo com o relatório de 2012 da Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente mais de 35 milhões de pessoas em todo o mundo têm demência, número que deverá duplicar em 2030 (66 milhões) e triplicar até 2050 (115 milhões) (WHO, 2012).

As demências são enfermidades neurológicas que afetam o cérebro, evoluem, progressivamente, destruindo as funções cognitivas, alterando o comportamento e a personalidade, interferindo nas atividades de vida diária (Volicer et al., 1997). A apresentação clínica típica é a progressiva perda de memória e funções cognitivas, levando a uma perda da independência e causando sérias complicações para o paciente e seus familiares, visto que, ainda, não existem fármacos que revertam os sintomas (Volicer et al., 1997). A síndrome demencial usualmente inicia na quinta ou sexta década de vida, e a idade e a baixa escolaridade são os fatores de risco mais importantes (Hestad et al., 2005). Outros fatores de risco importantes incluem a presença do alelo 4 da apolipoproteína E (APOE), história de traumatismo craniano com perda de consciência, fatores de risco cardiovascular descontrolados ao longo da vida (hipertensão, diabetes mellitus, dislipidemia) e estilo de vida sedentário (Ravona, 2003).

Dentre as demências, a DA é a mais prevalente e tem como uma das principais características fisiopatológicas a Taupatia (Boeras, 2009), devido ao aumento de emaranhados neurofibrilares intracelulares, compostos por agregados da proteína Tau hiperfosforilada, perda sináptica e aumento de placas senis constituídas de peptídeo β -amiloide (A β) extracelular (formado a partir do processo amiloidogênico da proteína precursora amiloide) (Serrano-Pozo et al., 2011). Estas mudanças são acompanhadas por astrogliose e ativação de células da microglia (Heneka et al., 2010). Acredita-se que as placas A β e os emaranhados neurofibrilares sejam as principais características desta doença, acompanhadas por uma marcante atrofia e perda de neurônios cerebrais (Nimmrich e Ebert, 2009).

Os depósitos extracelulares de A β e os emaranhados neurofibrilares intracelulares são encontrados em neurônios e células da glia de regiões cerebrais responsáveis pela memória e cognição. Dentre estas regiões com extensa neurodegeneração, encontram-se o sistema límbico (Arnold et al., 1991), regiões neocorticais (Terry et al., 1981) e o prosencéfalo basal (Teipel et al., 2005). Este processo neurodegenerativo é caracterizado pela destruição precoce das sinapses (Masliah e Terry, 1994; Masliah, 2000), com degeneração retrógrada dos axônios e eventual atrofia da árvore dendrítica (Coleman e Perry 2002; Higuchi et al., 2002; Grutzendler et al., 2007) e corpo celular (Lippa et al., 1992). Os depósitos de A β e emaranhados neurofibrilares são fatores precipitantes de múltiplas vias neurotóxicas, como excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo, depleção energética, inflamação, apoptose e disfunção das neurotrofinas associadas ao intenso prejuízo cognitivo (Hock, et al., 2000; Dong et al., 2009; Lau e Tymianski, 2010; Mehta et al., 2013; Octave et al., 2013).

1.2 MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA POR TAUPATIA COM ACIDO OCADAICO

O ácido ocadáico (AO) é uma toxina produzida por microalgas marinhas, que é um importante inibidor da enzima serina (Ser) / treonina (Thr) fosfatase, e é um inibidor específico da síntese de proteínas por hiperfosforilação do fator de alongamento EF2. Além disso, esta toxina, também, é responsável por muitas condições clínicas, tais como diarreia grave e dano de memória em humanos, após o consumo de crustáceos contaminados, levando a um quadro de envenenamento (Zhao et al., 2004).

Estudos mostraram que o AO provoca a morte das células do cérebro, *in vitro e in vivo* através da inibição da Ser/Thr fosfatase PP1 e PP2A que causa hiperfosforilação da Tau e desestabiliza os microtúbulos do citoesqueleto (Zhao et al., 2004). No cérebro, a proteína Tau desempenha um papel importante na estabilização de microtúbulos do citoesqueleto do neurônio (Kamat et al., 2014). Uma das características desse modelo de demência é a hiperfosforilação da proteína Tau, onde o AO diminui a atividade da PP2A no cérebro. Esta inibição pode estar relacionada à diminuição do processo de defosforilação da Tau, causando danos de memória induzida pela administração de AO (Ahmed et al., 2014). O AO induz alterações significativas neurológicas, tais como a neurodegeneração de hipocampo, a hiperfosforilação da proteína Tau e a formação de placas A β . O aumento na desmetilação

mediada pela PP2A, gerou uma sobreprodução de A β , podendo contribuir para reduzir a atividade da PP2A, danificando a proteína Tau e mantendo-a hiperfosforilada (Kamat et al., 2014).

A hiperfosforilação de Tau, devido à inibição da fosfatase, induz o estresse neuronal e a neurodegeneração subsequente. Isto ocorre, principalmente, devido à perda de células piramidais e as células apoptóticas no hipocampo, que compreende a região do cérebro responsável pelas funções de aprendizagem e memória (Kamat et al., 2014). A inibição da proteína PP2A, como descrito na figura 1, aumenta estresse oxidativo, podendo ativar GSK3 β que induz a hiperfosforilação da proteína Tau, além de ativar proteínas associadas a apoptose o que e leva a morte celular (figura 1). O AO, também, induz a fosforilação em Ser da e outros substratos, como ocorre na patogênese da DA (Ahmed et al., 2014). Um outro passo da demência é o que ocorre em certos neurotransmissores, tais como a acetilcolina, devido à perda neuronal e a formação neurofibrilar nos neurônios piramidais e suas sinapses. Neste mecanismo, há uma redução uniforme nos marcadores pré-sinápticos da atividade colinérgica, tais como da enzima acetilcolinesterase (AChE) e a Acetil colina transferase (ChAT). Estudos mostraram que, após a administração de AO em hipocampo de ratos, uma diminuição dos níveis de acetilcolina é observada, além de acarretar na hiperfosforilação de Tau. Essas mudanças foram acompanhadas de déficit na memória espacial (Wiltfang et al., 2009).

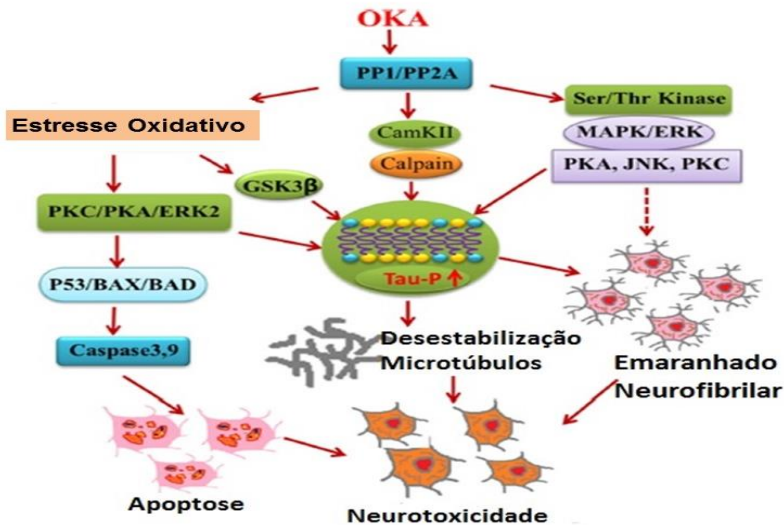


Figura 1 - Diagrama representativo do efeito do AO sob o estresse oxidativo, regulação da atividade das quinases, sob a hiperfosforilação da Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares levando a apoptose.

Também os efeitos acumulativos, promotores de neurotoxicidade, semelhantes aos mecanismos encontrados em demências tipo DA

Fonte: adaptado de Kamat et al. (2014).

O AO gera uma ativação do poro de transição da permeabilidade na mitocôndria e, por conseguinte, tem um papel importante na necrose das células do cérebro e apoptose (Chen et al., 2010). Isto leva à disfunção mitocondrial, que é, também, um contribuinte na demência, em que o seu principal dano está relacionado com o citocromo C oxidase, o que leva a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a redução das reservas de energia e dano no metabolismo energético (Chen et al., 2010). Em outro estudo, o AO infundido intrahipocampal na dose de 100ug, causou estresse oxidativo, déficit cognitivo, alterações gliais, aumento na carbonilação proteica e redução do teor de glutathiona (glutathiona reduzida) (Chen et al., 2010).

1.3 FORMAÇÃO DA MEMÓRIA E DEMÊNCIAS

1.3.1 Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura pequena situado dentro do lóbulo temporal central do cérebro e faz parte do sistema límbico. Compreende sub-regiões distintas (isto é, CA1 a CA3, giro dentado e subículo) e é parte da formação do hipocampo, que, também, inclui o córtex parahipocampal, perirrinal e entorrinal (Weilbächer e Gluth 2016).

A Figura 2 apresenta uma visão geral sobre a formação da memória e das vias de entrada e saída da formação do hipocampo. O papel do hipocampo na codificação, consolidação e recuperação da memória de longo prazo, especialmente da memória episódica, está bem estabelecida. Esta estrutura recebe informações de diversos órgãos dos sentidos, e a interação de suas sub-regiões inicia a formação da memória que vai ser associada com as ligações com outras regiões cerebrais como o córtex cerebral (Weilbächer e Gluth 2016).

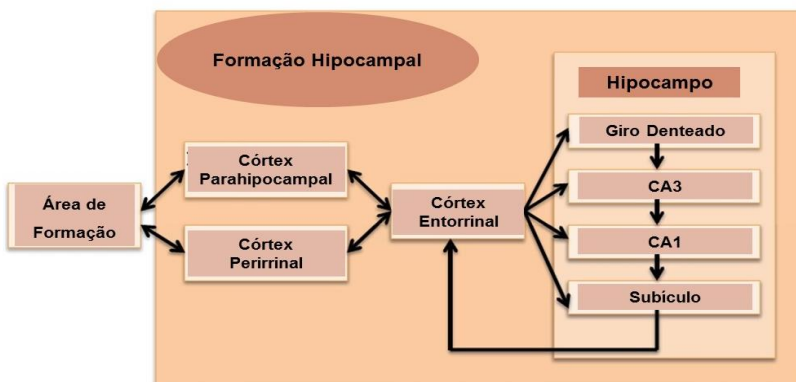


Figura 2 - Percursos de entrada e saída da formação do hipocampo.

Hipocampo através das suas diferentes regiões recebe informação que começa a ser processada e interage com outras regiões como córtex para formar a memória de longa duração.

Fonte: adaptado de Weilbächer e Gluth (2016).

Um dano causado ao hipocampo pode levar à uma perda de memória e uma dificuldade em reter novas memórias (Möhler e Rudolph, 2017). Em demências como a DA, os neurônios do hipocampo e do córtex entorrinal são os primeiros a degenerar, conduzindo à confusão e à perda de memória tão geralmente visto nas fases iniciais da doença (Kempuraj et al., 2016). Além disso, apontam para uma massiva perda de sinapses

(Weingarten et al., 2017) e a hiperfosforilação da Tau mais acentuada nessa região (Carrettiero et al., 2015). Portanto, esta área cerebral é bastante estudada quando se busca elucidar os danos causados pela demência. Além disso, uma diminuição na neurogênese hipocampal é associada ao déficit cognitivo e dificuldade na retenção de novas informações como ocorre na DA (Hollands et al., 2016).

1.3.2 Córtex pré-frontal

O córtex, geralmente, é associado à atenção, tomada de decisão e transformações senso-motoras, no entanto, estudos recentes de neuroimagem humana apoiam um papel adicional na recuperação da memória episódica (Sestieri et al., 2017). As regiões parietais envolvidas na percepção, atenção e memória são, em grande parte, segregadas e, muitas vezes, mostram uma relação, potencialmente, mediada por regiões pré-frontais. Além disso, as regiões exercem funções específicas, tais como obter informações, recodificar essas informações com base em demandas de tarefas ou acumular evidências para decisões de memória (Sestieri et al., 2017).

O córtex pré-frontal é uma região de desenvolvimento tardio do neocórtex. É também uma das regiões corticais a sofrer a maior expansão no curso da evolução e da maturação individual. No adulto humano, o córtex pré-frontal constitui quase um terço da totalidade do neocórtex (Fuster et al., 2002). A função executiva, mais geral do córtex pré-frontal lateral, é a organização temporal de ações dirigidas a metas nos domínios de comportamento, cognição e linguagem (Fuster et al., 2002).

Percepção e ciclos ativos de memória, tais como formação de memória a curto prazo, execução e recuperação, são resultados de conexões, recíprocas do córtex pré-frontal lateral com o hipocampo. Importantes para os aspectos cognitivos, essas conexões tornam possível uma função importante do córtex pré-frontal, que é a integração temporal de ações para o cumprimento de metas (Fuster et al., 2003). Para desempenhar esse papel, o córtex pré-frontal precisa ter acesso a todos os itens de informação: sensorial, motora e mnemônica, que dão forma à estrutura do comportamento (Fuster et al., 2003).

O córtex pré-frontal é afetado durante o desenvolvimento de demências, ocorrendo um hipometabolismo em pacientes com DA (Chiotis et al., 2016). Esta região, também, é bastante afetada por fatores externos que vão causar alterações, como, por exemplo, no DNA, como metilação que é aumentada durante o envelhecimento (Levine et al.,

2016). O córtex pode ser uma das primeiras regiões afetadas durante a DA por acumular A β , mesmo sem uma pronunciada formação de placas senis (Collins-Praino et al., 2014). Portanto, o estudo de como o modelo de Taupatias afeta essa estrutura se faz necessário.

1.3.3 Estriado

O estriado é uma estrutura que recebe a entrada de uma vasta área do manto cortical (Pennartz et al., 2009). Essa entrada está associada a outras conjunturas que são responsáveis pela regulação do comportamento e da cognição (Pennartz et al., 2009). Várias evidências sugerem que certas sub-regiões do neocórtex e do estriado recebem, através de uma entrada convergente, componentes de sistemas de aprendizagem e de memória como o hipocampo e a amígdala, e são, assim, colocados idealmente para desempenhar um papel regulador, através de uma cascata de circuitos em espiral, conectando regiões ventromediais do corpo estriado, cada vez mais dorsolateralmente (Haber et al., 2000).

Um efeito de transição de formação, sugere que o mecanismo, pelo qual o estriado age sobre o comportamento, demonstra um controle limiar associativo ao hipocampal sobre o comportamento animal. Esse padrão sugere a possibilidade de que o hipocampo esteja associado ao sistema estriado dorsal. Consistente com a ideia de que certas circunstâncias de formação de aprendizagem, o hipocampo e estriado contribuem para a consolidação dessas informações (McDonald e Hong, 2013). O cérebro de pacientes de demências, principalmente a DA, apresenta uma atrofia em diversas regiões cerebrais, inclusive, no núcleo caudado do estriado, a região dessa estrutura mais associada aos processos cognitivos (Pini et al., 2016). Entretanto, observou-se uma hipofunção estriatal, independente de atrofia em pacientes com DA, postulando que microalterações nessa região poderiam estar associadas com danos causados pela doença (O'Callaghan et al., 2014). A DA afeta, também, a produção de neurotransmissores e neuromoduladores nos estriado, diminuindo a funcionalidade dessa região afetando a memória e, muitas vezes, também, causando agressividade que pode ser regulada nessa região cerebral. (Kocahan e Doğan, 2017).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO NAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

O tecido cerebral é mais suscetível ao estresse oxidativo devido a sua maior taxa de consumo de oxigênio, alto teor de ácidos graxos, menor capacidade regenerativa e baixas quantidades de antioxidantes. Assim, os radicais livres parecem desempenhar um papel fundamental no processo de envelhecimento cerebral. Sendo assim, o estresse oxidativo, causado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) no cérebro, tem sido considerado como a causa subjacente para a patogênese de diversas doenças neurodegenerativas (Barnham et al., 2004).

A disfunção mitocondrial exacerba o estresse oxidativo, e consequentemente, os níveis de lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e de oxidação, nos neurônios vulneráveis à demência tipo DA (Correia et al., 2011). O acúmulo de radicais livres leva à excessiva peroxidação lipídica e à degeneração e morte neuronal. Acredita-se, também, que EROs atuam no processo de transformação física de placas de proteína B-amilóide em placas neuríticas, um dos componentes histopatológicos da demência tipo DA (Silva et al., 2011).

Lipídios, proteínas e grupos sulfidrilas, são moléculas que podem ser modificadas pela ação de radicais livres, e são, também, usadas como medidas indiretas do estresse oxidativo. Este desequilíbrio pode ser estimado, avaliando a atividade das enzimas envolvidas no balanço redox da célula, que inclui: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase (Lovell et al., 1998; Silva et al., 2011). O estresse oxidativo é um dos fatores que levam à predisposição de distúrbios neuronais. Eventos que levam à morte de células nervosas em doenças neurodegenerativas, compartilham um caminho em comum, o desencadeamento de estresse oxidativo por formação de radicais livres, excitotoxicidade, dano no metabolismo energético e comprometimento cognitivo (Silva et al., 2011).

A disfunção mitocondrial é associada com uma série de doenças crônicas cerebrais (Calabrese et al., 2005). A deficiência em vitamina E em roedores causou um comprometimento cognitivo na memória espacial, com danos ao hipocampo e córtex e que, após a suplementação, essa função cognitiva foi reestabelecida (Fukui et al., 2002). A vitamina E, também, foi utilizada com sucesso para o tratamento de um modelo animal de envelhecimento que causou estresse oxidativo e diminuição da performance cognitiva (Nagai et al., 2003). Rajput e Sarkar (2017), mostraram em um modelo de diabetes que causava déficit cognitivo por induzir neuroinflamação, estresse oxidativo e diminuição da atividade do sistema colinérgico, o tratamento

com antioxidantes revertia, significativamente, os níveis glicêmicos, a atividade inflamatória e melhorava a atividade da acetilcolina.

Estudos mostram que elevados níveis de marcadores de estresse oxidativo causam dano em DNA, aumento dos marcadores de peroxidação lipídica e conseqüente dano cognitivo (Figura 3). Acredita-se que esse estresse oxidativo pode prejudicar a função cognitiva, bem como a memória e estão associados a demência (Fukui et al., 2002; Calabrese et al., 2005; Rajput e Sarkar, 2017) e que agentes antioxidantes se mostram promissores no tratamento desse distúrbio (Halliwell, 2001; Nagai et al., 2003; Halliwell, 2006; Silva-Adaya, 2008; Hayashi, 2009; Polidori, 2004).

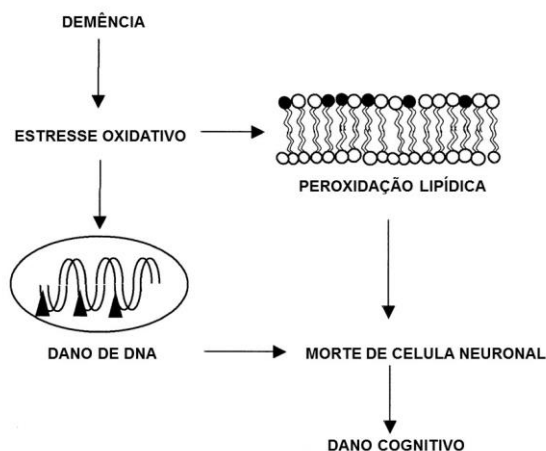


Figura 3 - Hipótese da demência associada ao estresse oxidativo, causando dano oxidativo de membranas neuronais e DNA em hipocampo.

O aumento do estresse oxidativo causa apoptose e dano de memória
Fonte: aptado de Nagai et al. (2003).

1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO

A nanotecnologia é um campo da ciência que tem se desenvolvido de maneira impressionante, juntamente com a biotecnologia, misturando o conhecimento da ciência dos materiais e da química com os da biologia. A nanobiotecnologia é um ramo da nanotecnologia que funde a ciência dos materiais com as ciências biológicas, gerando conhecimento e produtos nestas áreas (Bhattacharya e Mukherjee, 2008).

Durante as últimas décadas, as nanopartículas inorgânicas, cujas estruturas exibem funcionalidade e propriedades biológicas devido ao seu tamanho, têm despertado muito interesse de diferentes grupos e áreas de pesquisa e se postula que podem auxiliar em doenças cerebrais (Bhattacharya e Mukherjee, 2008). Dentre elas, destacam-se as nanopartículas de ouro (GNP), que recebem atenção especial devido às propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalítica (Daniel e Astruc, 2004). Com o envelhecimento da população, a entrega de drogas para o cérebro para o tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento continua a ser uma tarefa desafiadora. Alguns estudos têm mostrado que a GNP pode circular pelo sangue e pode chegar no cérebro, *in situ* e *in vivo*, com alterações não significativas na integridade da barreira hematoencefálica ou permeabilidade (Barathmanikanth et al., 2010). Embora o mecanismo exato de transporte não seja conhecido, a ausência de toxicidade para a certificação tanto *in situ* quanto *in vivo*, sugere que as GNP podem ser transportadas através da barreira por endocitose e / ou transcitose ou por difusão passiva, na ausência de abertura da barreira. Elas podem ser produzidas para imitar as lipoproteínas de baixa densidade e interagir com os seus receptores, desencadeando assim a absorção pelas células endoteliais do cérebro (Barathmanikanth et al., 2010).

Em um estudo anterior Pires et al. (2015), mostraram a eficácia da chegada de GNP em diversos tecidos, incluindo o cérebro. O lugar da modulação celular da GNP não está bem elucidada. Contudo, alguns dados mostram a mitocôndria como um possível alvo. Como efeito, a GNP modula a interação entre grupamentos amino ou tióis que são resíduos de proteínas de mitocôndrias (Huang, et al., 2005).

A utilização das GNP no tratamento de diversas doenças surge devido as evidências do efeito antioxidante do ouro no tratamento tradicional das doenças inflamatórias. As nanopartículas biometálicas formadas por ouro e platina são eficazes contra EROS, incluindo Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Kajita et al., 2007), agindo também sobre a GSH, que é um redutor livre do grupo funcional tiol, responsável pela desintoxicação dos peróxidos, tais como o H_2O_2 . No processo de desintoxicação, a GSH na forma reduzida é oxidada. Demais estudos confirmam o papel efetivo da GNP como um agente antioxidante, por inibir a formação de EROS, agindo como sequestrador de radicais livres, melhorando assim a ação de enzimas antioxidantes (Tsai, 2007; BarathManiKanth et al., 2010; Sul et al., 2010; Nie et al., 2012).

As GNP têm sido usados como anti-inflamatórios em tratamento para artrite reumatoide por mais de 50 anos (Zhang e Lippard, 2003; Eisler, 2003). Os efeitos anti-inflamatórios *in vivo* envolvem a supressão da ativação de macrófagos e micróglia em danos cerebrais (Larsen et al., 2008). Foi mostrado *in vitro*, que os mecanismos moleculares da ação do ouro implica na redução dos níveis de mediadores pro-inflamatórios, como as IL, TNF α e eicosanoides, e também na inativação de enzimas fagolisossomais, quinase indutora do I-kappa B (IkB-kinase), e atividade do NF- κ B (Wataha et al., 2004; Navarro et al., 2006; Han et al., 2008).

Pedersen e Larsen (2009), mostraram em seus resultados que as GNP reduzem TNF α em hipocampo, modula o estresse oxidativo em cérebro de ratos, reduz escape de citocromo C mitocondrial para o citoplasma de animais tratados, além de diminuir os níveis de Caspase-3 ativadas. Tsai (2007), reforça essa tese mostrando que as GNP têm efeito anti-inflamatório agindo em citocinas pró-inflamatórias com diminuição nos níveis de TNF- α e IL-1 β , bem como redução dos escores histológicos, densidade de microcapilares, infiltração de macrófagos em um modelo experimental de artrite. As GNP são utilizadas para o tratamento de várias doenças inflamatórias devido as suas propriedades biológicas, ópticas e químicas.

Este trabalho se justifica devido a ausência de drogas modificadoras para o tratamento das demências, portanto a busca de novos fármacos se faz necessária. Devido ao já conhecido efeito das GNP em doenças periféricas que apresentam estresse oxidativo e inflamação na sua etiologia, este composto pode ser efetivo também no sistema nervoso central, entretanto isto ainda não esta bem estabelecido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das Nanopartículas de Ouro sobre o déficit cognitivo, parâmetros de estresse oxidativo cerebral e fosforilação de Tau em um modelo animal de Taupatia induzida com AO.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a memória espacial de animais submetidos ao modelo animal de Taupatia induzida pelo AO;
2. Avaliar o efeito da GNP na capacidade antioxidante cerebral em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais submetidos ao modelo animal de Taupatia e o efeito do tratamento com GNP;
3. Avaliar o efeito da GNP sobre a capacidade oxidante em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais submetidos ao modelo animal de Taupatia induzido por AO;
4. Avaliar o efeito da GNP no imunoconteúdo da proteína pTau, no hipocampo e córtex pré-frontal de animais submetidos ao modelo animal de Taupatia induzida pelo AO;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 QUESTÕES ÉTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios e os procedimentos descritos pelo Comitê de ética do uso de Animais (CEUA) e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo nº 69/2014-1.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 90 ratos Wistar machos (60 dias, pesando em média 250g) obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram mantidos em gaiolas isoladas com ventilação, controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (60 – 80%) em ciclo de 12 horas claro-escuro, alimentados com dieta padrão para roedores e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos randomicamente em 6 grupos experimentais:

Grupo 1 – Sham + Salina (N=15)

Grupo 2 – Sham + GNP 2,5 mg/kg (N= 15)

Grupo 3 – Sham + GNP 5,0 mg/kg (N=15)

Grupo 4 – AO + Salina (N=15)

Grupo 5 – AO + GNP 2,5 mg/kg (N=15)

Grupo 6 – AO + GNP 5,0 mg/kg (N=15)

3.3 CRONOGRAMA EXPERIMENTAL

O cronograma experimental é apresentado na Figura 4. A Taupatia foi induzida através do ácido ocaidaico (AO) injetado por via intracerebroventricular (ICV) na dose de 100ug. O tratamento com GNP nas doses 2,5mg/kg e 5,0mg/kg por via intraperitoneal administrados a cada 48h por 21 dias, iniciou-se 24h após injeção de AO. Após o tratamento, os animais foram submetidos à avaliação da memória espacial pelo teste de Barnes maze. Após 24h, os animais foram mortos e o córtex pré-frontal, hipocampo e estriado retirados para as análises de parâmetros anti e pro oxidante.



Figura 4 - Cronograma experimental

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

3.4 INDUÇÃO DO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATAMENTO

AO foi utilizado para promover a hiperfosforilação da Tau e desestabilização do citoesqueleto (Zimmer et al., 2012). AO, diluído em salina, foi injetado intracerebroventricular (ICV) na dose de 100 ug (2uL total de infusão) durante cirurgia estereotáxica nas coordenadas 1mm lateral, 2,5mm posterior e 3 mm intracraniana em relação ao bregma. Os animais controles receberam da mesma maneira solução salina. Após 21 dias de tratamento os animais passaram pela tarefa comportamental para avaliar cognição e memória espacial. Um dia após o teste de memória os animais foram mortos por decapitação e o córtex pré-frontal, estriado e hipocampo retirados para análises bioquímicas conforme cronograma experimental (Figura 4).

3.5 TRATAMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

O tratamento com GNP iniciou 24hs após a indução de demência e a administração via intraperitoneal (IP), a cada 48hs, de tamanhos médios de 20 nm na dose de 2,5 mg/kg ou 5mg/kg. As GNP foram sintetizadas como descrito por Turkevich et al. (1951), a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) (Nuclear, SP, Brasil). Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de ácido tetracloroáurico, foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 90 °C e sob agitação a 700 rpm. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi adicionada, e o sistema mantido à temperatura descrita, agitando a 200 rpm durante 20

minutos. As soluções adquirem as colorações correspondentes a cada tamanho de GNP sintetizadas apresentando um pH de 5,8. Por conseguinte, o pH foi ajustado a pH fisiológico com solução tampão e, posteriormente, centrifugadas (13.000 rpm por 15 min), lavadas duas vezes com água ultrapura e, finalmente, disperso em solução salina onde a concentração da solução foi ajustada. A eficiência e a segurança deste protocolo do uso de GNP em animais já foi descrito, anteriormente, por Pires (2015).

3.6 PROTOCOLO DO TESTE COMPORTAMENTAL BARNES MAZE

Após o tratamento com GNP foi avaliada a performance cognitiva. Para avaliar a memória espacial utilizou-se um protocolo de labirinto de Barnes adaptado de Yang et al. (2013). O aparelho de labirinto é um disco de 1,0 m de diâmetro levantado 75 cm do chão contendo 18 furos de escape possível, um dos quais leva a uma caixa de escape escuro. A luz acesa foi usada para aumentar a motivação para a fuga. Os animais foram treinados para localizar a caixa escura, permitindo-lhes explorar o labirinto, durante 60 segundos. Se os animais não encontrassem a caixa de fuga dentro do prazo eram, suavemente, encorajados a entrar nela. As experimentações terminavam quando os animais encontravam a caixa da fuga ou após 60 segundos. Os animais foram treinados, durante 5 dias, para aprender a localização da caixa de escape do labirinto, utilizando sinais espaciais na sala de testes. Após os treinos, no 6º dia, os animais foram submetidos ao teste de retenção de memória, a caixa de escape foi retirada do equipamento. Foi avaliado quanto tempo os animais exploravam o quadrante alvo, onde ficava a caixa escape, num tempo total de 60 segundos.

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Um dia após o teste de Barnes Maze, os animais foram eutanasiados por guilhotina e as amostras de córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram homogeneizadas em tampão específico e utilizadas para a realização das seguintes técnicas bioquímicas:

3.7.1 Marcadores de Danos Oxidativos e atividade e conteúdo de enzimas antioxidantes

Conteúdo de Sulfidrilas: As amostras de córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram homogeneizadas em tampão de fosfato salina 0,1M pH 7,4. O conteúdo total de tióis (TT) foi determinado numa reação dos grupos tióis com 5,5 ditióbis (ácido nitro-benzóico) (DTNB). A leitura do conteúdo de TT foi feita espectrofotometricamente (412nm) e expressa em DTNB/mg de proteína. Esta técnica verifica a quantidade de sulfidrilas (SH) não oxidadas que estão presentes nos aminoácidos (Aksenov e Markesberya, 2001).

Diclorofluoresceína – DCFH/DA: As amostras de córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram homogeneizadas em tampão de fosfato salina 0,1M pH 7,4. As amostras foram incubadas com 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (10 uM) a 37°C durante 30 minutos, e a formação foi cessada a 4°C. DCFH-DA foi desesterificado no interior das células por esterases endógenas para o ácido livre ionizado. DCF-DA foi então oxidado por hidroperóxidos. A formação do derivado fluorescente oxidada (DCF) foi monitorado com excitação e emissão de comprimentos de onda de 488 e 525 nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência SpectraMax (de acordo com o método descrito anteriormente por Le Bel e Bondy (1990).

Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO): A produção de NO foi avaliada, espectrofotometricamente, através do metabólito estável nitrito. As amostras de córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram homogeneizadas em tampão de fosfat salina 0,1M pH 7,4. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com o reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM, realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram calculados em µmol Nitrito/mg proteína (Cho e Chaea, 2004).

Superóxido Dismutase (SOD): Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras de córtex pré-frontal, hipocampo e estriado foram homogeneizadas em tampão de fosfat salina 0,1M pH 7,4. Os volumes de 5, 10 e 15 µl foram retiradas da mesma, a qual 5 ml de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5 µl adrenalina (60 mM em água destilada + 15 ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180 segundos em intervalos de 10 segundos, em leitor de

ELISA a 480 nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

Atividade da Catalase (CAT): A atividade da CAT foi determinada com base na taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), presente na amostra, utilizando uma solução de H₂O₂ a 10mM em tampão de fosfato de potássio (50mM), pH 7,0. Dois mililitros da solução de H₂O₂ e 20mL foram colocados numa cuvete de quartzo. Após a homogeneização, a taxa de decomposição de H₂O₂ máxima foi medida em espectrofotômetro a 240nm e os valores foram expressos como unidades de catalase/mg de proteína.

Glutathione (GSH): Os níveis de GSH reduzida foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. A GSH foi mensurada em homogenado de córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, após precipitação de proteína com 1 mL de proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 µM DTNB. O desenvolvimento de cor resultante, a partir da reação entre o DTNB e tióis, atingiu um máximo em 5 minutos e se manteve estável durante mais de 30 min. A absorbância de 412 nm, depois de 10min, foi lida em comparação à curva padrão de glutathione reduzida usada para calcular os níveis de GSH reduzida nas amostras.

3.8 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING

Após os resultados de estresse oxidativo indicarem que hipocampo e córtex pré-frontal foram susceptíveis a ação das GNP, optou-se por utilizar essas estruturas para avaliar o imunoconteúdo de pTau ser396. As amostras de hipocampo foram homogeneizadas em tampão de composto por duodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, Tris 50 mM, EDTA 100mM e β-mercaptoetanol 8%, pH 6,8. As amostras (60µg) foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS (SDS-PAGE) em um sistema "mini-gel" (BioRad). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham). As proteínas de interesse foram identificadas através do uso de anticorpos específicos anti- (pTau ser 396, Cell signaling 1:1000 e actina, Invitrogen1:15000). A revelação dos imunoblottings foi realizada através de quimioluminescência e exposta ao filme de RX em cassete de revelação autoradiográfica. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um scanner (HP 3400) e o programa Imaje J (NIH).

3.9 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas foram mensuradas de acordo com o método de Lowry et al. (1951), e albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

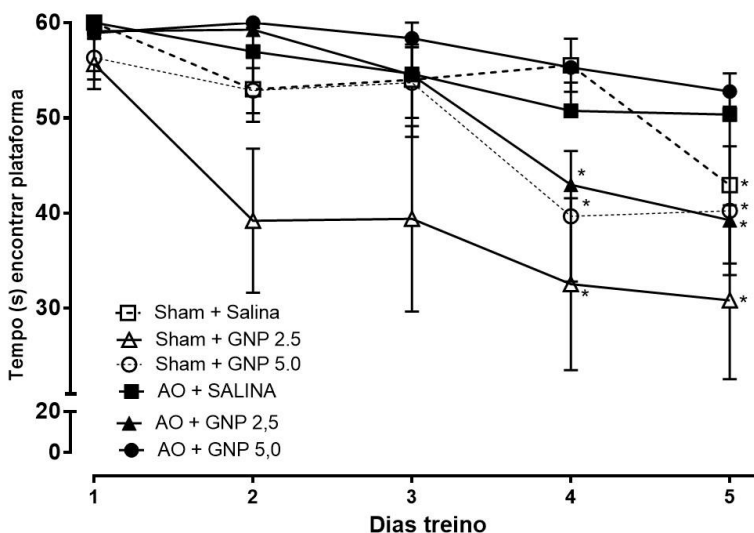
Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. Os resultados, quando comparados todos os grupos, foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO AO E DO TRATAMENTO COM GNP NA MEMÓRIA ESPACIAL AVALIADA PELO TESTE DE BARNES MAZE

A memória espacial foi avaliada pelo teste de Barnes Maze. Durante a fase de aquisição da memória, nos 5 dias de treinamento, os grupos Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5, diminuíram a latência para encontrar a plataforma nos dias 4 e 5 de treino em relação ao dia 1 (Figura 5 A. * 4 e 5 dias treino < 1 dia treino; $p < 0.05$). Entretanto, os grupos AO + Salina e AO + GNP 5,0, não apresentaram esse aprendizado, mostrando um déficit na formação da memória induzido por AO. Na fase de retenção da memória, no dia teste, os grupos AO + Salina e o AO + GNP 5,0, apresentaram um menor tempo gasto no quadrante onde estava a plataforma, quando comparado com os outros grupos (Figura 5 B.* AO + Salina e o AO + GNP 5,0 < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5; $p < 0.05$), mostrando um déficit cognitivo na retenção da memória causado pelo modelo de demência neste tipo de memória.

A)



B)

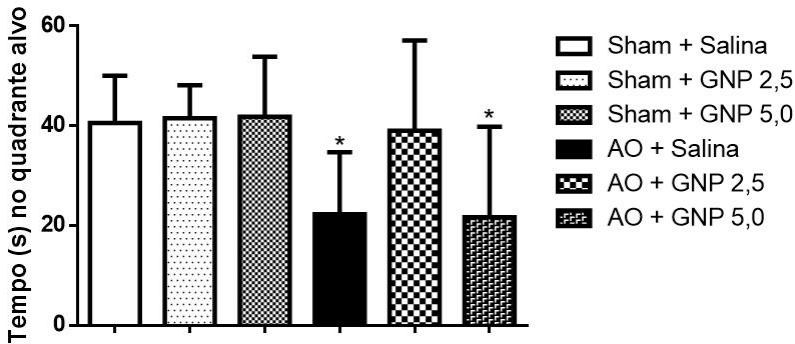


Figura 5 - A memória espacial foi avaliada pelo teste de Barnes Maze.

A) Fase de aquisição (* dias treino 4 e 5 < dia 1; $p < 0.05$). B) Dia teste, fase de retenção (* AO + Salina e o AO + GNP 5,0 < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5; $p < 0.05$). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$; $n = 15/\text{grupo}$.

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM HIPOCAMPO, CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E ESTRIADO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATADOS COM GNP.

4.2.1 Níveis de GSH

A capacidade antioxidante foi avaliada em estruturas de cérebro de ratos. Os níveis de GSH foram diminuídos em córtex pré-frontal do grupo AO+salina comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 (Figura 6 A) (#AO + GNP 2,5 > AO + Salina $p < 0.05$). No Hipocampo, os níveis foram diminuídos nos grupos AO+Salina e AO+GNP 5,0 (*AO + Salina e AO + GNP 5,0 < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 (Figura 6 B) (#AO + GNP 2,5 > AO + Salina $p < 0.05$). Os níveis de GSH em estriado não apresentaram alteração significativa (Figura 6 C).

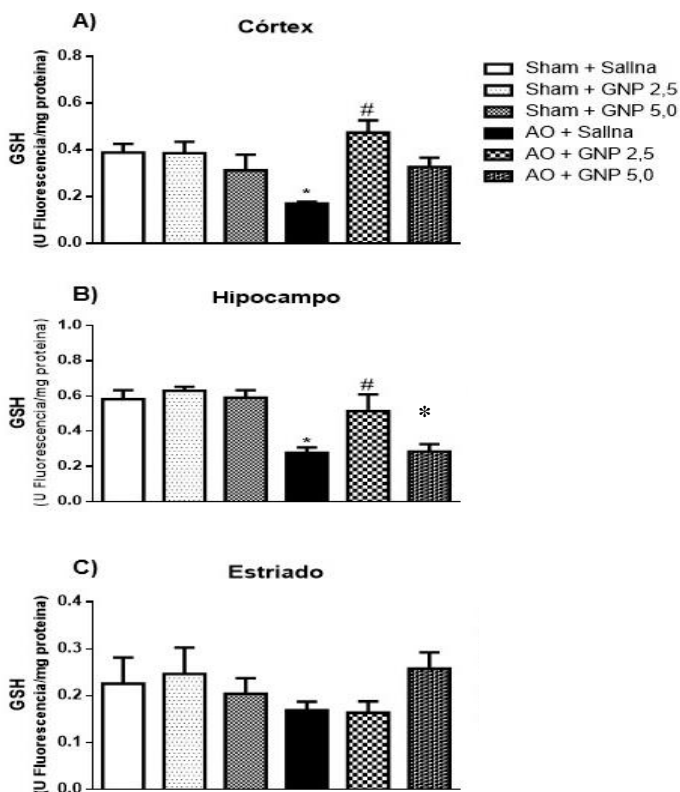


Figura 6 - Os níveis de GSH foram diminuídos em córtex pré-frontal

A) do grupo AO+Salina comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 (#AO + GNP 2,5 > AO + Salina $p < 0.05$). B) Hipocampo os níveis foram diminuídos nos grupos AO+Salina e AO+GNP 5,0 (*AO + Salina e AO + GNP 5,0 < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 (#AO + GNP 2,5 > AO + Salina $p < 0.05$). C) Os níveis de GSH em estriado não apresentaram alteração significativa. ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$; $n=5$ /grupo.

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

4.2.2 Atividade da SOD

A atividade da SOD foi diminuída em córtex pré-frontal do grupo AO+Salina comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$) (Figura 7 A). No hipocampo, a atividade da SOD foi diminuída do grupo AO + Salina comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 (#AO + GNP 2,5 > AO + Salina $p < 0.05$). (Figura 7 B). No estriado, a atividade da SOD foi diminuída do grupo AO + Salina, AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0, comparado com outros grupos (*AO + Salina, AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0 < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0; $p < 0.05$) (Figura 7 C).

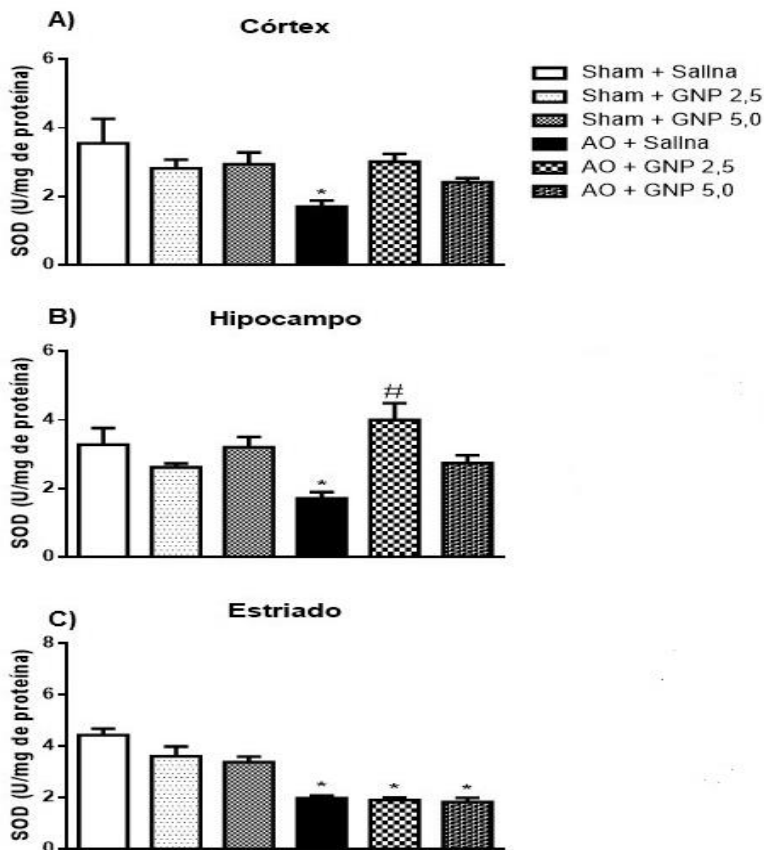


Figura 7 - A atividade da SOD.

A) Córtecx: A atividade da SOD foi diminuída por AO (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$). B) Hipocampo, a atividade da SOD foi diminuída no grupo AO comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5. (#AO + GNP 2,5 > AO + Salina $p < 0.05$). C) Estriado a atividade da SOD foi diminuída nos grupos AO comparado com outros grupos (*AO + Salina, AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0 < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0; $p < 0.05$). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$ $n=5$ /grupo.

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

4.2.3 Atividade da Catalase

Em córtex pré-frontal, a atividade da CAT foi diminuída no grupo AO + Salina comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$) (Figura 8 A). Já em hipocampo e estriado, a atividade da CAT foi diminuída no grupo AO + Salina comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 em ambos os tecidos (#AO + GNP 2,5 > AO + Salina $p < 0.05$) (Figura 8 B e C).

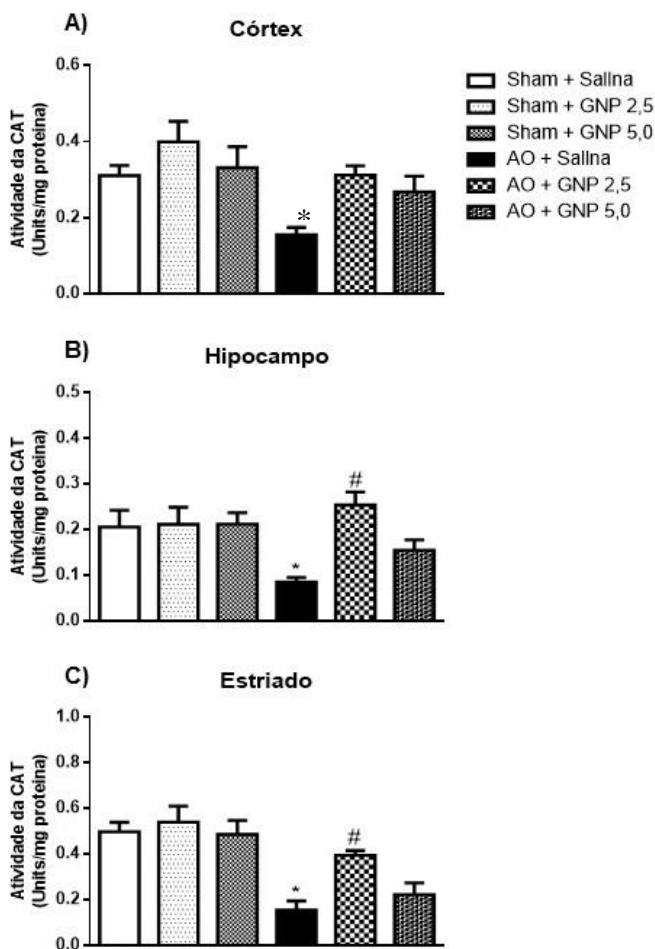


Figura 8 - Atividade da CAT.

A) Córte pré-frontal, Hipocampo (B) e Estriado (C) a atividade da catalase foi diminuída no grupo AO comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$) e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 (#AO + GNP 2,5 > AO + Salina $p < 0.05$). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$; $n=5$ /grupo.

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

4.2.4 Níveis de Sulfidrila

Os níveis de grupamento sulfidrila em córtex pré-frontal não apresentaram diferença significativa (Figura 9 A). Os níveis de grupamento sulfidrila foram diminuídos em hipocampo do grupo AO + Salina comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 e 5,0 (#AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0 > AO + Salina $p < 0.05$) (Figura 9 B). Os níveis de grupamento sulfidrila foram diminuídos em estriado do grupo AO + Salina e AO + GNP 5,0, comparado com outros grupos (*AO + Salina e AO + GNP 5,0 < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5; $p < 0.05$) (Figura 9 C).

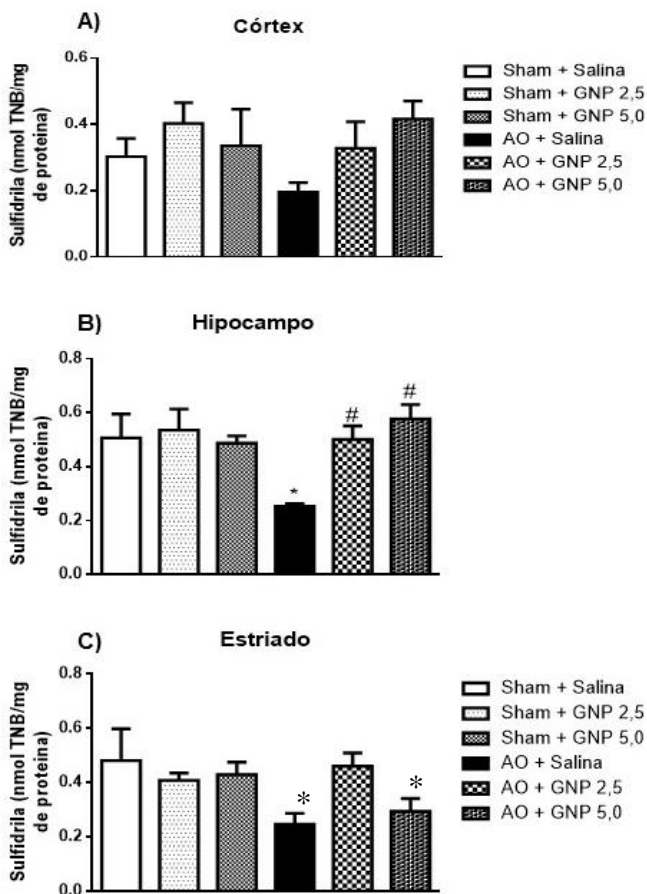


Figura 9 - Os níveis de grupamento sulfidril.

A) Córtex pré-frontal não apresentou diferença significativa. B) Hipocampo diminuição no grupo AO comparado com outros grupos (*AO + Salina < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 e 5,0 (#AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0 > AO + Salina $p < 0.05$). C) os níveis de grupamento sulfidril foram diminuídos em estriado do grupo AO e AO + GNP 5,0, comparado com outros grupos (*AO + Salina e AO + GNP 5,0 < Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5; $p < 0.05$). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$; $n=5$ /grupo.

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

4.3 ATIVIDADE PRÓ-OXIDANTE EM HIPOCAMPO, CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E ESTRIADO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATADOS COM GNP.

4.3.1 Níveis de nitrito

Os níveis de nitrito foram aumentados em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, respectivamente, do grupo AO + Salina comparado com outros grupos (*AO + Salina > Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 em todos os tecidos (#AO + GNP 2,5 < AO + Salina; $p < 0.05$). (Figura 10 A, B e C).

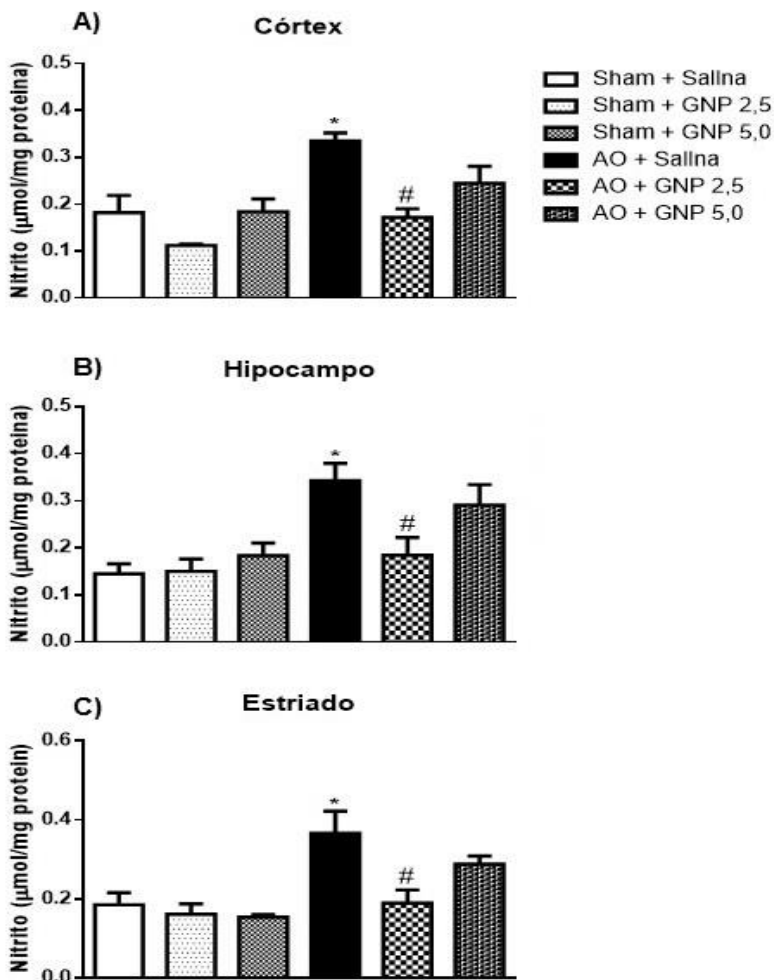


Figura 10 - Os níveis de nitrito foram aumentados em córtex pré-frontal

A), hipocampo (B) e estriado (C), respectivamente, do grupo AO comparado com outros grupos (*AO + salina > Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 em todos os tecidos (#AO + GNP 2,5 < AO + Salina; $p < 0.05$). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$; $n=5$ /grupo.

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

4.3.2 Níveis de DCF

Os níveis de DCF foram aumentados em córtex pré-frontal (Figura 11 A), Hipocampo (Figura 11 B) e Estriado (Figura 11 C) do grupo AO + Salina comparado com outros grupos (AO + Salina > Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0, AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0 $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 e 5,0 quando comparado com o grupo AO (#AO + Salina > AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$ com GNP 2,5 (Figura 11 C).

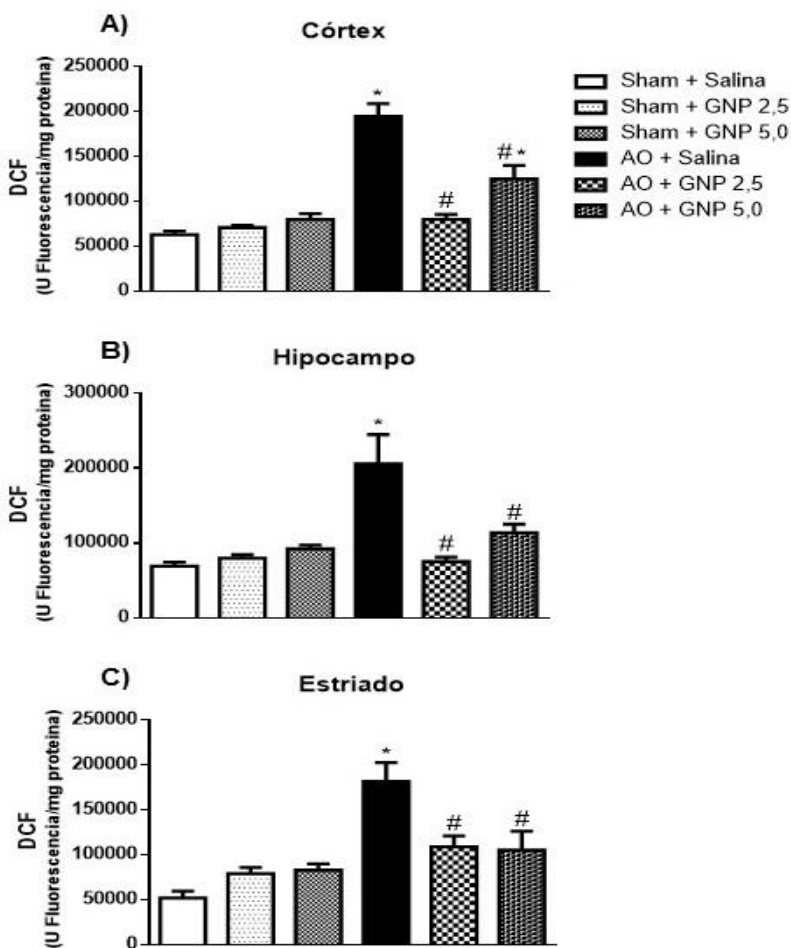


Figura 11 - Os níveis de DCF foram aumentados em córtex pré-frontal

(A), Hipocampo (B) e Estriado (C) do grupo AO comparado com outros grupos (AO + Salina > Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0, AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0 $p < 0.05$), e estes níveis foram normalizados pelo tratamento com GNP 2,5 e 5,0 quando comparado com o grupo AO (#AO + Salina > AO + GNP 2,5 e AO + GNP 5,0; $p < 0.05$). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$; $n=5$ /grupo.

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

4.4 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING EM HIPOCAMPO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATADOS COM GNP POR IP.

4.4.1 Fosforilação de Tau em córtex e hipocampo

A fosforilação de Tau foi avaliada em córtex pré-frontal e hipocampo considerando serem as estruturas mais associadas a memória estudada nest estudo nestas estruturas. A proteína Tau fosforilada (pTau ser 396) foi aumentada em córtex pré-frontal e hipocampo dos grupos AO + Salina e AO + GNP 5,0, comparado com outros grupos (AO + Salina e AO + GNP 5,0> Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5; $p < 0.05$) (Figura 12 A e B).

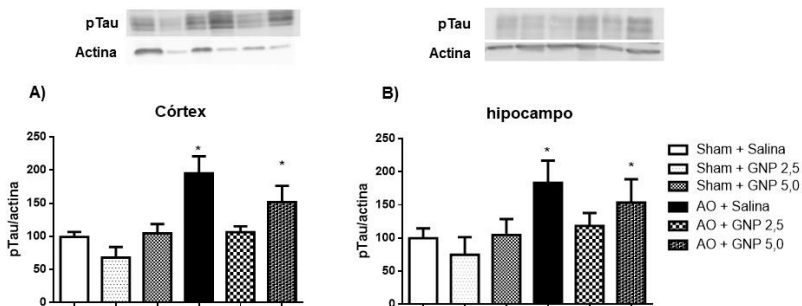


Figura 12 - Proteína Tau fosforilada (pTau ser 396)

A) Córtex pré-frontal e B) Hipocampo a pTau foi aumentada nos grupos AO e AO + GNP 5,0, comparado com outros grupos (AO + Salina e AO + GNP 5,0> Sham + Salina, Sham + GNP 2,5, Sham + GNP 5,0 e AO + GNP 2,5; $p < 0.05$). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$; $n=5$ /grupo.

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

5 DISCUSSÃO

A pesquisa mostrou um déficit cognitivo na memória espacial induzido por AO. Isso ocorreu tanto na fase de formação quanto de retenção dessa memória. Além disso, observou-se um aumento do estresse oxidativo cerebral, principalmente, no hipocampo e córtex, regiões associadas com a formação dessa memória e, também, o aumento de fosforilação de Tau induzido por AO. O tratamento com GNP na dose de 2,5 mg/kg a cada 48h preveniu o déficit cognitivo observado no grupo AO, bem como o estresse oxidativo e a hiperfosforilação de Tau, mostrando-se, potencialmente, eficaz como uma possível droga no combate aos danos induzidos por Taupatas.

A proposta do uso de GNP para reduzir o efeito oxidante da Taupatia mostrou-se promissora e devido à falta de toxicidade desse protocolo (Pires, 2015) acredita-se que as GNP's possam ter uso terapêutico. Fatores como a forma, o tamanho, o revestimento de superfície e carga afetam as propriedades físico-químicas e a maneira com que essas moléculas interagem com sistemas biológicos (Kelly et al., 2003; Sengani e Rajeswari, 2017). Um estudo, usando GNP's de 5nm, na forma de aerossol, revelou que insetos, após a exposição do aerossol sintetizado, aumentaram, linearmente, a concentração de GNP no cérebro (Raliya et al., 2017).

Sonavane et al., (2008), Pires (2015) e Umair et al., (2016), em seus estudos realizaram avaliações sobre a nanotoxicidade de alguns materiais, dentre eles, o ouro, e constataram que as partículas de tamanho de 15 a 50 nm foram encontradas em fígado, rim, coração e cérebro, sem toxicidade nesses órgãos. Já se sabe que as GNP's ultrapassam a barreira hematocefálica (Gao et al., 2017; Ruff et al., 2017). Porém, estudos conclusivos de que as mesmas agem diretamente no hipocampo e córtex pré-frontal ainda são escassos. Isto demonstra uma possível nova estratégia terapêutica para o tratamento de demências tipo DA que envolvam disfunção dessas regiões cerebrais. As GNP's no tratamento utilizadas via intraperitoneal modularam os efeitos deletérios do AO, pois reverteram o déficit cognitivo, melhoraram a capacidade antioxidante e diminuíram o estresse oxidativo no cérebro.

O tamanho da nanopartícula e a forma como são administradas, ainda, são alvos de muita controvérsia. Gao et al. (2017) mostrou que partículas de 3nm a 36nm aceleraram a fibrilação de A β . Já as partículas de 2nm poderiam adiar, de modo significativo, a fibrilação, enquanto as partículas de 0,7 a 1,9nm poderiam inibir, completamente, este processo. Esse resultado foi encontrado *in vitro*, após 48h de incubação

com proteína A β (1-40). Em discordância de Gao et al. (2017), Liao et al. (2012), mostraram em seus estudos que a co-incubação de GNP de tamanho 30nm carregadas, de forma negativa, com A β reduziram, significativamente, a toxicidade de A β em neuroblastoma. Em geral, observa-se que as GNP's que possuem potencial de superfície negativo servem como nano-chaperones para inibir e redirecionar a fibrilação A β , o que poderia contribuir para aplicações na DA (Liao et al., 2012).

BarathManiKanth et al. (2010), fizeram um estudo de curva dose das respostas das concentrações de GNP, onde obtiveram uma melhor resposta na dose de 2,5mg/kg para a redução dos níveis glicêmicos, e da toxicidade causada pelo diabetes. Após, administrou essa dose em camundongos por 15 dias, para tratar os danos causados pelo diabetes, e verificou um papel eficaz das GNP's como um agente antioxidante, inibindo a formação de ROS, eliminando radicais livres, aumentando, assim, as enzimas de defesa antioxidantes e se mostrando um potencial tratamento para doenças crônicas tais como diabetes.

A utilização das GNP's no tratamento de diversas doenças é embasado nas evidências do efeito antioxidante do ouro (Tsai, 2007). Os resultados deste estudo mostraram a eficácia das GNPs no seu potencial antioxidante, levando a uma reversão do quadro oxidativo causado pelo AO. Outros estudos confirmaram o papel efetivo da GNP como um agente antioxidante, por inibir a formação de ROS, devido às nanopartículas biometálicas serem formadas por ouro e platina, elas agem como elementos sequestradores de radicais livres, melhorando, assim, a ação de enzimas antioxidantes (BarathManiKanth et al., 2010; Sul et al., 2010; Nie et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que o AO, um inibidor de Ser/Thr fosfatase, inibe a defosforilação da proteína Tau e leva a um desequilíbrio, gerando hiperfosforilação, sendo este um ótimo modelo para mimetizar o dano cognitivo e a perda de memória, como observado em pacientes com demência tipo a DA (Cohen,1990). Estudo com administração intra-hipocampal de AO (100 mg) mostraram que, após doze dias, os animais desenvolveram comprometimento cognitivo espacial, acompanhado por astrogliose hipocampal (como evidenciado pelo aumento do GFAP) e estresse oxidativo (através da diminuição da glutamina sintetase e diminuição do teor reduzido de glutatona) (Costa et al., 2012; Nazem et al., 2015; Broetto et al., 2016).

A Taupatia atinge diretamente o centro da memória e da cognição. Com isso, a importância de entender a interconexão das estruturas responsáveis pela formação da memória, tais como hipocampo, córtex pré-frontal e estriado. O hipocampo é uma das estruturas responsáveis

pela formação da memória de longa duração e, em conjunto com o córtex pré-frontal, mantém intacta a consciência e algumas funções cognitivas, como a linguagem. Quando ocorre algum dano que gera um mal funcionamento do córtex pré-frontal e do estriado, observa-se alterações dos estados afetivos, tais como: expressões de raiva, alegria, tristeza e ternura (Fuster et al., 2002; Pennartz et al., 2009; Weilbacher e Gluth, 2016; Sestieri et al., 2017). Essas características são observadas em demências do tipo DA, que têm como característica fisiopatologia a Taupatia (McDonald e Hong, 2013).

Regiões específicas do cérebro como córtex pré-frontal, hipocampo e estriado são afetados diretamente por demências, entretanto, esses efeitos podem ser diferente entre essas regiões (Nie et al., 2012). Avaliando a atividade antioxidante no modelo de AO, observou-se que foi induzido um estresse oxidativo nesse modelo e que foi prevenido pela dose de 2,5mg/kg de GNP, principalmente em córtex pré-frontal e hipocampo. Este estudo testou duas doses de GNP (2,5 e 5,0 mg/kg), com o intuito de obter a melhor dose resposta para ser utilizada como forma de tratamento antioxidante e anti-inflamatório, considerando as propriedades já descritas na literatura (Tsai, 2007; BarathManiKanth et al., 2010; Sul et al., 2010). Diante dos resultados, acredita-se que a dose de GNP 2,5mg/kg no tamanho de 20nm seja promissora para o tratamento de demências que apresentem Taupatia, como a DA. Além desse efeito benéfico, estudo anterior mostrou que a GNP, na dose de 2,5mg/kg, diferente de outras drogas propostas no mercado atualmente, não apresenta efeitos colaterias (Pires, 2015). Outro estudo mostrou o potencial antioxidante das GNP's em um modelo de lesão cerebral focal em que o tratamento com ouro reduziu, significativamente, os níveis cerebrais de TNF α , dano ao DNA e marcadores pró-apoptóticos, quando comparados com os animais que não receberam o tratamento após a lesão, mostrando o ouro como uma ferramenta importante para modular a resposta à lesão cerebral (Pedersen et al., 2009).

Pires (2015) mostrou em seu estudo a segurança do protocolo de uso de GNP's a cada 48h na dose e tamanho utilizados neste trabalho por análises histopatológicas, que mostraram ausências de focos inflamatórios em células hepáticas. Assim, os resultados deste estudo reforçam a segurança do protocolo escolhido e da dose utilizada. O uso da dose 2,5mg/kg é bem aceita na literatura e a mesma traz resultados significativos na depleção de marcadores oxidativos e aumento nas enzimas antioxidantes (BarathManiKanth et al., 2010), assim como os resultados desta pesquisa mostraram.

Diversos estudos avaliaram as mudanças bioquímicas em ratos submetidos ao AO e observaram alterações gliais e aumento do estresse oxidativo (Pennartz et al., 2009; McDonald e Hong, 2013; Weilbacher e Gluth, 2016). Os resultados deste estudo mostraram que ratos que receberam AO apresentaram uma redução significativa em seu potencial antioxidante. O aumento do dano oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação levam à morte neuronal (Barnham et al., 2004). Há alguns anos, intervenções terapêuticas e pesquisas na área do balanço redox estão sendo realizadas para uma possível aplicação em doenças neurodegenerativas (Halliwell, 2006).

Estudos mostram que, durante um dano em tecido cerebral, os níveis de estresse oxidativo aumentam e sua atividade antioxidante reduz (Baxter e Hardingham, 2016). A primeira alteração cerebral é na funcionalidade e atividade do sistema antioxidante da glutatona, que é considerado o principal sistema antioxidante cerebral (Aoyama e Nakaki, 2015; Gu et al., 2015). Cruz-Álvarez et al. (2017) em seu trabalho, mostraram que, após usar um modelo de dano oxidativo com ácido quinolinico, os níveis de GSH e de mRNA de Nrf2 estavam reduzidos em estriado, e que, após o tratamento com Apocinina, um inibidor do complexo NADPH oxidase, houve aumento da GSH e o dano cognitivo foi revertido. O resultado deste trabalho mostrou que o AO causa uma diminuição da GSH em córtex e hipocampo e, também, déficit cognitivo na memória espacial. O tratamento com GNP na dose de 2,5mg/kg preveniu a diminuição da GSH em córtex e foi, nesse grupo, que ocorreu a prevenção ao prejuízo da performance cognitiva, que é determinada pela interação entre as regiões cerebrais principalmente córtex e hipocampo, mostrando que níveis normais de GSH nessas estruturas são essências para a atividade cognitiva e que este complexo pode ser um alvo da GNP no SNC. Esses resultados merecem novos estudos considerando que o sistema glutatona envolve mais do que somente os níveis de GSH, portanto a atividade da glutatona peroxidase (GPx) de ve ser analisada, bem como ser uma relação com outras enzimas antioxidantes que fornecem substratos para GPx.

O estresse oxidativo é uma condição biológica decorrente do desequilíbrio entre as atividades oxidantes e antioxidantes no corpo, conduzindo à produção excessiva de EROs, radicais livres e peróxidos. Estudos mostram que elevados níveis de marcadores de estresse oxidativo coincidem com uma redução da atividade da SOD, aumento do dano em DNA, aumento dos marcadores de peroxidação lipídica e consequente dano cognitivo (Halliwell, 2001; Nagai et al., 2003;

Halliwell, 2006; Silva-Adaya, 2008; Hayashi, 2009). Demais estudos confirmam o papel efetivo da GNP's como um agente antioxidante, por inibir a formação de EROs, agindo como sequestrador de radicais livres, melhorando, assim, a ação de enzimas antioxidantes (Tsai, 2007; BarathManiKanth et al., 2010; Sul et al., 2010; Nie et al., 2012).

Arjmand et al. (2016) mostraram em um modelo de demência tipo DA, com estreptozotocina, que os níveis da SOD estavam reduzidos, significativamente, e que apresentaram um dano cognitivo, após um tratamento com fármacos antagonistas de receptor angiotensina, os níveis de SOD foram restaurados e os danos cognitivos revertidos, mostrando que a SOD está diretamente relacionada no sistema de defesa e comprometimento cognitivo. O resultado deste estudo mostrou que o AO causa uma diminuição da atividade da SOD que poderia estar associada a uma menor dismutação do H₂O₂, que levaria a uma maior produção de ROS em todas as regiões cerebrais avaliadas. O tratamento com GNP na dose de 2,5mg/kg preveniu a diminuição da atividade da SOD em córtex e hipocampo induzida por AO, entretanto, não preveniu no estriado. O resultado da GNP 2,5mg/kg no modelo de Taupatia corrobora a hipótese de que essas moléculas podem melhorar a atividade antioxidante no córtex pré-frontal e hipocampo e prevenir um déficit cognitivo.

A versão mitocondrial da teoria dos radicais livres do envelhecimento propõe que as mitocôndrias são as fontes primárias de ROS e os principais alvos de danos induzidos por ROS (Dai et al., 2017). Este estudo mostrou que os níveis da catalase foram reduzidos em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado do grupo AO + Salina. O mesmo resultado foi encontrado em um estudo em que um modelo animal de hipóxia crônica reduziu os níveis de catalase e que, após o tratamento com grelina, os danos foram revertidos e a atividade da catalase restaurada significativamente (Omrani et al., 2017). O tratamento com GNP na dose de 2,5mg/kg preveniu a diminuição da atividade da catalase em hipocampo e estriado induzida por AO, no entanto, não preveniu em córtex. O resultado da GNP 2,5mg/kg no modelo de Taupatia corrobora a hipótese de que essas moléculas podem melhorar a atividade antioxidante no hipocampo e estriado e prevenir um déficit cognitivo.

O estresse oxidativo afeta diversas estruturas e funções das células cerebrais, causando dano à membrana celular, às proteínas e pode estar associado ao excesso de produção de óxido nítrico que vai gerar excesso na produção de radicais livres de nitrogênio (RLN) (Aanaeigoudari et al., 2016). A estrutura e função das proteínas envolvem uma série de fatores como conformação e sequência dos aminoácidos e, também, a

ligação a outras moléculas como o grupamento tiol. Esse grupamento está envolvido diretamente na estruturação das proteínas e se diminuído em alguma região, como, por exemplo, no cérebro, pode indicar uma disfunção das proteínas daquela região. Este trabalho mostrou que o grupamento sulfidril está diminuído no hipocampo e no estriado no grupo AO. Um estudo com um modelo de isquemia cerebral, causou dano oxidativo, cognitivo e que, após o tratamento com chá verde como antioxidante, esse quadro foi revertido, melhorando os níveis de sulfidril, dano cognitivo e restabelecendo a memória, isso foi observado pelos testes de campo aberto e reconhecimento de objetos (Altermann et al., 2017). O tratamento com GNP preveniu este dano em hipocampo e, provavelmente, manteve intacta as estruturas proteicas da região estudada.

O excesso na produção de RLN pode aumentar a produção de ROS, bem como ele mesmo pode ser um causador de dano a estruturas da célula como a mitocôndria que se sabe está envolvida na etiologia da DA (Asimwe et al., 2016). A atividade da óxido nítrico sintase induzível aumentada, que produz excesso de óxido nítrico, foi associada com hiperfosforilação da Tau e dano semelhante à DA e outras Taupatas (Wang et al., 2017). Os resultados deste estudo mostraram que os níveis de nitrito aumentaram em córtex, hipocampo e estriado no modelo de AO e que os mesmos foram prevenidos com o tratamento com GNP 2,5.

O estudo mostrou que, em relação aos níveis de DCF, um marcador de produção de ROS, que este esteve aumentado em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado e que a GNP foi capaz de reverter este aumento. Estudos demonstraram a capacidade das GNPs em inibir a peroxidação lipídica, impedindo a geração de EROs, efeitos de controle de GNP como antioxidante (Yakimovich et al., 2008) e seu potencial de neutralizar os radicais livres em neurônios (Junpingchen et al., 2006). Estes resultados, também, são suportados pelos achados que sugerem a não citotoxicidade da GNP's (Junpingchen et al., 2006).

Quanto ao modelo utilizado, o AO causa hiperfosforilação da Tau, que está associada a alterações no exoesqueleto celular e formação de emaranhados neurofibrilares (Kamat et al., 2014; Ahmed et al., 2014). Esses emaranhados já foram associados a déficit cognitivo tanto em pacientes (Tian et al., 2004; Rajasekar et al., 2013) quanto em modelos animais de demência (Costa et al., 2011). Os emaranhados neurofibrilares estão associados a dano nas estruturas cerebrais (Sosa et al., 2013). Devido aos principais efeitos antioxidantes das GNPs terem sido observados no córtex pré-frontal e hipocampo optou-se por avaliar

a fosforilação de Tau nestas estruturas. O resultado, como era esperado, mostrou um aumento da fosforilação da Tau no grupo que recebeu AO + Salina em córtex-pré-frontal e hipocampo, e a GNP na dose de 2,5mg/kg foi capaz de prevenir este efeito. Estes resultados são compatíveis aos resultados observados na cognição. A enzima GSK beta pode causar a hiperfosforilação de Tau, e o aumento da atividade dessa quinase é observado em modelos de demência como a DA (Gürsel et al., 2015). A diminuição da fosforilação de Tau em hipocampo e córtex no modelo de AO pode mostrar que as GNP's por um mecanismo ainda a ser descoberto regulam a fosforilação de proteínas e pode, ainda, estabilizar o exoesqueleto mesmo em modelos de Taupatia. A sinalização GSK e CDK 5/p25 são afetadas pelo modelo de AO (Zimmer et al., 2012) e podem auxiliar para entender esse processo e serão feitas para elucidar estas questões.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que a indução de demência por Taupatia causa prejuízo da performance cognitiva em relação à memória espacial, aumento do estresse oxidativo, diminuição da capacidade antioxidante e aumento da fosforilação da Tau em estruturas cerebrais. O tratamento crônico com GNP, na dose de 2,5mg/kg, com tamanho de 20nm administrados, a cada 48h, foi eficaz na prevenção do déficit cognitivo, bem como evitou o estresse oxidativo e a hiperfosforilação da Tau em córtex pré-frontal e hipocampo. Estes resultados apontam a GNP como uma droga promissora para o tratamento de Taupatias.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar as vias de sinalização inflamatórias no córtex pré-frontal e hipocampo.
- Avaliar as vias de sinalização anti-inflamatórias no córtex pré-frontal e hipocampo
- Avaliar as citocinas inflamatórias no córtex pré-frontal e hipocampo.
- Avaliar as citocinas inflamatórias no sangue.
- Avaliar as citocinas anti-inflamatórias no córtex pré-frontal e hipocampo.
- Avaliar as citocinas anti-inflamatórias no sangue.
- Avaliar proteínas associadas a hiperfosforilação de Tau no córtex pré-frontal e hipocampo

REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-6.
- Ahmed T, Blum D, Burnouf S, Demeyer D, Buée-Scherrer V, D'Hooge R, Buée L, Balschun D. Rescue of impaired late-phase long-term depression in a Tau transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*. 2014; S0197-4580(14)00620-4.
- Altermann CD, Souza MA, Schimidt HL, Izaguirry AP, Martins A, Garcia A, Santos FW, Mello-Carpes PB. Short-term green tea supplementation prevents recognition memory deficits and ameliorates hippocampal oxidative stress induced by different stroke models in rats. *Brain Res Bull*. 2017; S0361-9230(17)30160-0.
- Anaeigoudari A, Soukhtanloo M, Shafei MN, Sadeghnia HR, Reisi P, Beheshti F, Behradnia S, Mousavi SM, M. Neuronal nitric oxide synthase has a role in the detrimental effects of lipopolysaccharide on spatial memory and synaptic plasticity in rats. *Pharmacol Rep*. 2016; 68(2):243-9.
- Aoyama K, Nakaki T. Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules*. 2015; 14;20(5):8742-58.
- Arjmand Abbassi Y, Mohammadi MT, Sarami Foroshani M, Raouf Sarshoori J. Captopril and Valsartan May Improve Cognitive Function Through Potentiation of the Brain Antioxidant Defense System and Attenuation of Oxidative/Nitrosative Damage in STZ-Induced Dementia in Rat. *Adv Pharm Bull*. 2016 6(4):531-539.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex* 1991; 1:103-16.
- Asiimwe N, Yeo SG, Kim MS, Jung J, Jeong NY. Nitric Oxide: Exploring the Contextual Link with Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 7205747.

Aksenov MY, Markesberya WR. Changes in thiol content and expression of glu- tathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; 302:141-5

Bannister J V, Calabrese L, Assays for SOD. *Meth. Biochem. Anal.*1987; 32, p. 279-312.

Barathmanikanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, et al.. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J Nanobiotechnol.* 2010; 8:1-16.

Barnham KJ. Masters CL. Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(3):205-14.

Baxter PS, Hardingham GE. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radic Biol Med.* 2016; 100:147-152.

Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008; 60:1289-1306.

Boeras DI. Alzheimer's disease: amyloid-beta, Tau protein or both? 193. *Dement Neuropsychol.* 2009; 3:188-194.

Broetto N, Hansen F, Brolese G, Batassini C, Lirio F, Galland F, Dos Santos JP, Dutra MF, Gonçalves CA. Intracerebroventricular administration of okadaic acid induces hippocampal glucose uptake dysfunction and Tau phosphorylation. *Brain Res Bull.* 2016; 124:136-43.

Brookmeyer R. et al. National estimates of the prevalence of Alzheimer's disease in the United States. *Alzheimers Dement.* 2011; 7:61-73.

Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella AM, Butterfield DA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci.* 2005; 233(1-2):145-62.

Camps P., Formosa X., Galdeano C., Munoz-Torrero D., Ramirez L., Gomez E., Isambert N., Lavilla R., Badia A., Clos M.V., Bartolini M.,

Mancini F., Andrisano V., Arce, M.I. Rodriguez-Franco M.P., Huertas O., Dafni T., Luque F.J., Pyrano [3, 2-c]quinoline-6-chlorotacrine hybrids as a novel family of acetylcholinesterase- and betaamyloid-directed anti-Alzheimer compounds, *J. Med. Chem.* 2009; 52 5365–5379.

Carrettiero DC, Santiago FE, Motzko-Soares AC, Almeida MC. Temperature and toxic Tau in Alzheimer's disease: new insights. *Temperature (Austin)*. 2015; 2(4):491-8

Chen TF, Huang RF, Lin SE, Lu JF, Tang MC, Chiu MJ. Folic Acid potentiates the effect of memantine on spatial learning and neuronal protection in an Alzheimer's disease transgenic model. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20:607-15.

Chiotis K, Saint-Aubert L, Savitcheva I, Jelic V, Andersen P, Jonasson M, Eriksson J, Lubberink M, Almkvist O, Wall A, Antoni G, Nordberg A. Imaging in-vivo tau pathology in Alzheimer's disease with THK5317 PET in a multimodal paradigm. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2016; 43(9):1686-99

Cho Ws, Chae C. Expression of nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase-2 in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Pathol.* 2004; 41(6):666-72.

Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends BiochemSci.* 1990; 15(3):98-102.

Coleman MP, Perry VH. Axon pathology in neurological disease: A neglected therapeutic target. *Trends Neurosci.* 2002; 25:532-37.

Collins-Praino LE, Francis YI, Griffith EY, Wiegman AF, Urbach J, Lawton A, Honig LS, Cortes E, Vonsattel JP, Canoll PD, Goldman JE, Brickman AM. Soluble amyloid beta levels are elevated in the white matter of Alzheimer's patients, independent of cortical plaque severity. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 17;2:83.

Correia, et al. Insulin-Resistant Brain State: the culprit in sporadic Alzheimer's Disease. *Ageing Res Rev.* 2011; 10(2):264-273.

Costa AP, Tramontina AC, Biasibetti R, Batassini C, Lopes MW, Wartchow KM, et al. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behav Brain Res.* 2012; 226(2):420–7.

Costa AP, Tramontina AC, Biasibetti R, Batassini C, Lopes MW, Wartchow KM, Bernardi C, Tortorelli LS, Leal RB, Gonçalves CA. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behav Brain Res.* 2011; 15;226(2):420-7.

Cruz-Álvarez S Santana-Martínez R, Avila-Chávez E, Barrera-Oviedo D, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD. Apocynin protects against neurological damage induced by quinolinic acid by an increase in glutathione synthesis and Nrf2 levels. *Neuroscience.* 2017; S0306-4522(17)30169-0.

Dai DF, Chiao YA, Martin GM, Marcinek DJ, Basisty N, Quarles EK, Rabinovitch PS. Mitochondrial-Targeted Catalase: Extended Longevity and the Roles in Various Disease Models. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 146:203-241.

Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applicationstoward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 2004; 104:293-346.

Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2009; 30:379-87.

Fukui K, Omoi NO, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, Urano S. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 959:275-84.

Fuster, J. M. Frontal lobe and cognitive development. *J Neurocytol.* 2002; 31(3-5), 373-385.

Fuster, J. M. *Cortex and mind: unifying cognition.* New York: Oxford University 2003; in Press

Gao G, Zhang M, Gong D, Chen R, Hu X, Sun T. The size-effect of gold nanoparticles and nanoclusters in the inhibition of amyloid- β fibrillation. *Nanoscale*. 2017; Epub ahead of print

Grutzendler J, Helmin K, Tsai J, Gan WB. Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*. 2007; 1097:30-9.

Gu F, Chauhan V, Chauhan A. Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015; 18(1):89-95.

Gürsel DB, Banu MA, Berry N, Marongiu R, Burkhardt JK, Kobylarz K, Kaplitt MG, Rafii S, Boockvar JA. Tight regulation between cell survival and programmed cell death in GBM stem-like cells by EGFR/GSK3b/PP2A signaling. *J Neurooncol*. 2015; 121(1):19-29.

Haber SN, Fudge JL, McFarland NR. Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci*. 2000; 20:2369–2382

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001; 18(9):685-716.

Halliwell, Barry. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 2006; 97, 1634–1658

Han, S., Kim, K., Kim, H., Kwon, J., Lee, Y.H., Lee, C.K., Song, Y., Lee, S.J., Ha, N., Kim, K., Auranofin inhibits overproduction of pro-inflammatory cytokines, cyclooxygenase expression, and PGE2 production in macrophages. *Arch. Pharm. Res*. 2008; 31,67–74.

Hayashi M. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology*. 2009; 29(1):1-8.

Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev*. 2010; 63:189-211.

Hestad K, Kveberg B, Engedal K. Low blood pressure is a better predictor of cognitive deficits than the apolipoprotein e4 allele in the oldest old. *Acta NeurolScand*. 2005; 111:323-328.

Higuchi M, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau and axonopathy in neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* 2002; 2:131-50.

Hissin, P.J., Hilf, R., 1976. Afluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* 1976; 214–216.

Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol.* 2000; 57:846-51.

Hollands C, Bartolotti N, Lazarov O. Alzheimer's Disease and Hippocampal Adult Neurogenesis; Exploring Shared Mechanisms. *Front Neurosci.* 2016; 10: 178.

Huang, Y., Erdmann, N., Peng, H., Zhao, Y., Zheng, J., The role of TNF related apoptosis-inducing ligand in neurodegenerative diseases. *Cell Mol. Immunol.* 2005; 2, 113–122.

Junpingchen S, Patil S, James F. McGinnis : Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat. Nanotechnol.* 2006; 1(2):142-50.

Kajita M, Hikosaka K, Iitsuka M, Kanayama A, Toshima N, Miyamoto Y. Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Free Radical Research.* 2007; 41: 615-626.

Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C. Mechanism of synapse redox stress in Okadaic acid (ICV) induced memory impairment: Role of NMDA receptor. *Neurochem Int.* 2014; 76:32-41.

Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C. Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application. *Mol Neurobiol.* 2014; 50(3):852-65

Kelly K. Lance, Coronado Eduardo, Zhao Lin Lin, Schatz George C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment *J. Phys. Chem. B,* 2003; 107 (3), pp 668–677

Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, Zaheer S, Iyer SS, Zaheer A. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine*. 2016; 1(1).

Kocahan S, Doğan Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2017; 28;15(1):1-8.

Laird F.M., Cai H., Savonenko A.V., Farah M.H., T. Melnikova K. He, Wen H., Chiang H.C, Xu G., Koliatsos V.E., Borchelt D.R., Price D.L., Lee H.K., Wong P.C. BACE1 a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta, amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions, *J.Neurosci*. 2005; 25:11693–11709.

Larsen, A., Kolind, K., Pedersen, D.S., Doering, P., Pedersen, M.O., Danscher, G., Penkowa, M., Stoltenberg, M., 2008. Treatment with metallic gold particles reduces neuroninflammation and apoptotic cell death after focal brain injury. *Histochem. Cell. Biol*. 2008; 130, 681–692.

Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers. Arch-Eur. J. Physiol*. 2010; 460:525-42.

Leal RB, Cordova FM, Lynn H, Bobrovskaya L, Dunkley PR. Lead-stimulate p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002; 178:44-51.

Lebel C. P., Bondy S. C. Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes. *Neurochem*. 1990, Int. 17:435–440.

Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. Epigenetic age of the prefrontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. *Aging (Albany NY)*. 2015; 7(12):1198-211.

Liao YH, Chang YJ, Yoshiike Y, Chang YC, Chen YR. Negatively charged gold nanoparticles inhibit Alzheimer's amyloid- β fibrillization,

induce fibril dissociation, and mitigate neurotoxicity. *Small*. 2012; 8(23):3631-9.

Lippa CF, Hamos JE, Pulaski-Salo D, DeGennaro LJ, Drachman DA. Alzheimer's disease and aging: Effects on perforant pathway perikarya and synapses. *Neurobiol Aging*. 1992; 13:405-11.

Lovell, MA., Xie, C&Markerbery, WR. Decreased glutathiontransferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1998; 51:1562-1566.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.* 1951; 193, 265.

Masliah E, Terry R. The role of synaptic pathology in the mechanisms of dementia in Alzheimer's disease. *Clin Neurosci*. 1994; 1:192-98.

Masliah E. The role of synaptic proteins in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 924:68-5.

McDonald RJ, Hong NS. How does a specific learning and memory system in the mammalian brain gain control of behavior? *Hippocampus*. 2013; 23(11):1084-102.

Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*. 2013; 698:6-18.

Milner, B.; Squire, L.R.; Kandel, E.R. Cognitive neuroscience review and the study of memory. *Neuron* 1998; 20, 445-468

Möhler H, Rudolph U. Disinhibition, an emerging pharmacology of learning and memory. *F1000Res*. 2017; 3;6.: F1000 Faculty Rev-101.

Nagai T, Yamada K, Kim HC, Kim YS, Noda Y, Imura A, Nabeshima Y, Nabeshima T. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J*. 2003; (1):50-2.

Navarro, M., Fraile, G., Velásquez, M., González, E., Escalona, J., Ilanjan, R., Abad, M.J., Taylor, P., Effect of a gold-chloroquine

complex on nflammation-related leukocyte functions and cell viability. Comparison with auranofin. *Arzneimittelforschung*. 2006; 56, 826–833.

Nazem A, Sankowski R, Bacher M, Al-Abed Y. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2015; 17;12:74.

Nie J, Zhou M, Lü C, Hu X, Wan B, Yang B, Li Y. Effects of triptolide on the synaptophysin expression of hippocampal neurons in the AD cellular model. *Int Immunopharmacol*. 2012; 13:175-80.

Nimmrich V, Ebert U. Is Alzheimer's disease a result of presynaptic failure? Synaptic dysfunctions induced by oligomeric beta-amyloid. *Rev Neurosci*. 2009; 20:1-2.

Nishimura M, Okimura Y, Fujita H, Yano H, Lee J, Suzaki E, Inoue M, Utsumi K, Sasaki J. Mechanism of 3-nitropropionic acid-induced membrane permeability transition of isolated mitochondria and its suppression by L-carnitine. *Cell Biochem Funct*. 2008; 26(8):881-91.

O'Callaghan C, Bertoux M, Hornberger M. Beyond and below the cortex: the contribution of striatal dysfunction to cognition and behaviour in neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014; 85(4):371-8.

Octave JN, Pierrot N, Ferao Santos S, Nalivaeva NN, Turner AJ. From synaptic spines to nuclear signaling: nuclear and synaptic actions of the amyloid precursor protein. *J Neurochem*. 2013; *J Neurochem*. 2013 Jul;126(2):183-90.

Omrani H, Alipour MR, Farajdokht F, Ebrahimi H, Abbasi MM, Mohaddes G. Effects of Chronic Ghrelin Treatment on Hypoxia-Induced Brain Oxidative Stress and Inflammation in a Rat Normobaric Chronic Hypoxia Model. *High Alt Med Biol*. 2017; Epub ahead of print.

Pedersen MO, Larsen A, Pedersen DS, Stoltenberg M, Penkowa M. Metallic gold reduces TNFalpha expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury. *Brain Res*. 2009; 1271:103-13.

Pedersen, M.O., A. Larsen, D.S. Metallic gold reduces TNF α expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury. *Brain Research*. 2009; 1271:103-113.

Pennartz CM1, Berke JD, Graybiel AM, Ito R, Lansink CS, van der Meer M, Redish AD, Smith KS, Voorn P. Corticostriatal Interactions during Learning, Memory Processing, and Decision Making. *J Neurosci*. 2009; 14;29(41):12831-8.

Pini L, Pievani M, Bocchetta M, Altomare D, Bosco P, Cavedo E, Galluzzi S, Marizzoni M, Frisoni GB. Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Res Rev*. 2016; 30:25-48.

Pires, A.J. Avaliação dos efeitos da administração crônica de nanopartículas de ouro sobre parâmetros moleculares e bioquímicos em modelo de demência em ratos. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Disponível no Acervo 113610, DIS 615.1 P667a 2015.

Polidori M C. Oxidative stress and risk factors for Alzheimer`s disease: clues to prevention and therapy. *J. Alzheimer`s Dis*. 2004; 6:185-191.

Rajasekar N, Dwivedi S, Tota SK, Kamat PK, Hanif K, Nath C, Shukla R. Neuroprotective effect of curcumin on okadaic acid induced memory impairment in mice. *Eur J Pharmacol*. 2013; 715(1-3):381-94.

Rajput MS, Sarkar PD. Modulation of neuro-inflammatory condition, acetylcholinesterase and antioxidant levels by genistein attenuates diabetes associated cognitive decline in mice. *Chem Biol Interact*. 2017; 268:93-102.

Raliya R, Saha D, Chadha TS, Raman B, Biswas P. Non-invasive aerosol delivery and transport of gold nanoparticles to the brain. *Sci Rep*. 2017; 16;7:44718.

Ravona SR, Davidson M, Noy S. The role of cardiovascular risk factors in Alzheimer`s disease. *CNS Spectr*. 2003; 8:824-833.

Reisberg B. Diagnostic criteria in dementia: a comparison of current criteria, research challenges, and implications for DSM-V. *J. Geriatr Psychiatry Neurol*. 2006; 19:137-146.

Ruff J, Hüwel S, Kogan MJ, Simon U, Galla HJ. The Effects of Gold Nanoparticles Functionalized with β -Amyloid Specific Peptides on an in vitro Model of Blood-Brain Barrier. *Nanomedicine*. 2017; S1549-9634(17)30035-7

Sengani M, Rajeswani VD. Identification of potential antioxidant indices by biogenic gold nanoparticles in hyperglycemic Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017; 50:11-19.

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2011; 1:a006189.

Sestieri C, Shulman GL, Corbetta M. The contribution of the human posterior parietal cortex to episodic memory. *Nat Rev Neurosci*. 2017; 18(3):183-192.

Silva M, Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. *Arq Bras Endocrinol Metab*. São Paulo. 2011; 55(1):46-53.

Silva-Adaya D, Pérez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernández J, Binienda Z, Ali SF, Santamaría A. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem*. 2008; 105(3):677-89

Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2008; 66(2):274-80. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.07.004

Sosa S, Ardizzone M, Beltramo D, Vita F, Dell'Ovo V, Barreras A, Yasumoto T, Tubaro A. Repeated oral co-exposure to yessotoxin and okadaic acid: a short term toxicity study in mice. *Toxicol*. 2013; 15;76:94-102.

Sul OJ, Kim JC, Kyung TW, Kim HJ, Y, Kim SH, Kim JS, Choi HS. Gold nanoparticles inhibited the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclast formation by acting as an

antioxidant. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2010; 74: 2209-13.

Teipel SJ, FlatzWH, Heinsen H, Bokde AL, Schoenberg SO, Stockel S, Dietrich O, Reiser MF, Moller HJ, Hampel H. Measurement of basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease using MRI. *Brain* 2005; 128:2626-44.

Terry R, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian D. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol*. 1981; 10:184-92.

Tian Q, Lin ZQ, Wang XC, Chen J, Wang Q, Gong CX, Wang JZ. Injection of okadaic acid into the meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit. *Neuroscience*. 2004; 126(2):277-84.

Tsai Ch, Shiau A, Chen S. Amelioration of collagen-Induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis & Rheumatism*. 2007; 56: 544-554.

Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 1951; 11, 55–75.

Umair M, Javed I, Rehman M, Madni A, Javeed A, Ghafoor A, Ashraf M. Nanotoxicity of Inert Materials: The Case of Gold, Silver and Iron. *J Pharm Pharm Sci*. 2016; 19(2):161-80

Volicer L, Berman SA, Cipolloni PB, Mandell A. Persistent vegetative state in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1997; 54:1382-1384.

Wang Y, Veremeyko T, Wong AH, El Fatimy R, Wei Z, Cai W, Krichevsky AM4. Downregulation of miR-132/212 impairs S-nitrosylation balance and induces Tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2017; 51:156-166.

Wataha, J.C., Lewis, J.B., Volkmann, K.R., Lockwood, P.E., Messer,R.L., Bouillaguet, S., Sublethal concentrations of Au (III), Pd (II), and Ni(II) differentially alter inflammatory cytokine secretion from activated monocytes. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater*. 2004; 69, 11–17.

Weilbacher RA, Gluth S. The Interplay of Hippocampus and Ventromedial Prefrontal Cortex in Memory-Based Decision Making. *Brain Sci.* 2016; 29;7(1). pii: E4.

Weingarten, J, Weingarten, M, Wegner, M, Volkandt, W. APP—A Novel Player within the Presynaptic Active Zone Proteome. *Front Mol Neurosci.* 2017; 10: 43.

Wiltfang J, Lewczuk P, Rieder P, Grunblatt E, Hock C, Scheltens P, Hampel H, Vanderstichele H, Iqbal K, Galasko D, Lannfelt L, Otto M, Esselman H, Henkel AW, Kornhuberg J, Blennow K. Consensus paper of the WFSBP Task Force on biological markers of dementia: The role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. *Rev Psiquiatr.* 2009; 36(1):1-16.

WHO: World Health Organization. Dementia: a public health priority. Geneva. 2012. Acessado dia 10/04/17. Disponível: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75263/1/9789241564458_eng.pdf

Yang Y, Cudaback E, Jorstad NL, Hemingway JF, Hagan CE, Melief EJ, Li X, Yoo T, Khademi SB, Montine KS, Montine TJ, Keene CD. APOE3, but Not APOE4, Bone Marrow Transplantation Mitigates Behavioral and Pathological Changes in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *Am J Pathol.* 2013;183:905–917

Zhang, C.X., Lippard, S.J., New metal complexes as potential therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003; 7, 481–489.

Zhao K; Zhao G; Wu Z. Cell-permeable Peptide Antioxidants Targeted to Inner Mitochondrial Membrane inhibit Mitochondrial Swelling, Oxidative Cell Death, and Reperfusion Injury. *Journal of Biological Chemistry.* 2004; 279: 34682–34690.

Zimmer ER, Kalinine E, Haas CB, Torrez VR, Souza DO, Muller AP, Portela LV. Pretreatment with memantine prevents Alzheimer-like alterations induced by intrahippocampal okadaic acid administration in rats. *Curr Alzheimer Res.* 2012; 9(10):1182-90.

APÊNDICE

APÊNDICE A - CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS PARTÍCULAS DE NANO OURO E DO ULTRASSOM EM MODELO DE DEMÊNCIA E DIABETES”** Protocolo nº.088/2015-1 sob a responsabilidade de **Alexandre Pastoris Muller** e equipe: **Sabrina da Silva, Camila Simon Amarante, Joice de Abreu Brandolf, Beatriz Antunes Giusti Furtado, Débora de Souza, Paulo Cesar Lock Silveira**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, em reunião de: 30/06/2015.

Vigência do Projeto	02/07/2015 à 02/07/2016
Espécie/linhagem	Rattus norvegicus (Ratos Wistar)
Nº. De animais	105
Peso/idade	250gr / 2 meses
Sexo	M
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 088/2015-1


Principal Investigator: Alexandre Pastoris Muller

Researchers: Sabrina da Silva, Camila Simon Amarante, Joice de Abreu Brandolf, Beatriz Antunes Giusti Furtado, Débora de Souza, Paulo Cesar Lock Silveira

Project title: Evaluation of effects of gold nanoparticles and ultrasound on dementia model and diabetes

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, 01 de julho de 2015.


VILSON HEINZEN CARDOSO
Coordenador Adjunto da CEUA