

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

ALESSANDRA ZANETTE GHISI FRASSETTO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MEMÓRIA E
INFLAMAÇÃO NA PROLE ADULTA E IDOSA DE RATAS
COM DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO DE ACIDO
FÓLICO NA GESTAÇÃO**

CRICIÚMA

2016

ALESSANDRA ZANETTE GHISI FRASSETTO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MEMÓRIA E
INFLAMAÇÃO NA PROLE ADULTA E IDOSA DE RATAS
COM DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO DE ACIDO
FÓLICO NA GESTAÇÃO**

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

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

CRICIÚMA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F843a Frassetto, Alessandra Zanette Ghisi.

Avaliação dos parâmetros de memória e inflamação da prole adulta e idosa de ratas com deficiência ou suplementação de ácido fólico na gestação / Alessandra Zanette Ghisi Frassetto; orientador: Josiane Budni. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

89 p : il. ; 21 cm.

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

1. Ácido fólico – Uso terapêutico. 2. Envelhecimento – Prevenção. 3. Processo inflamatório. 4. Citocinas. I. Título.

CDD. 22^a ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

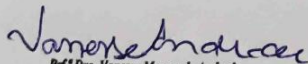
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

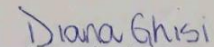
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 254

Com início às 15h00 (quinze horas) do dia quatorze do mês de julho de 2016 (dois mil e dezesseis), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Alessandra Zanette Ghisi Frassetto**, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a **Josiane Budni**, intitulada “**Avaliação dos parâmetros de memória e inflamação na prole adulta e idosa de ratas com deficiência ou suplementação de ácido fólico na gestação**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.^a Dr.^a Gabriela Trevisan dos Santos (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof.^a Dr.^a Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Prof.^a Dr.^a Patrícia de Souza Brocardo (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h00 (dezesseis horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.^a Dr.^a Vanessa Moraes de Andrade Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 14 (quatorze) de julho de 2016 (dois mil e dezesseis).


Prof.^a Dr.^a Vanessa Moraes de Andrade
Coordenadora Adjunta PPGCS
UNESC

Prof.^a Dr.^a Vanessa Moraes de Andrade
Coordenadora Adjunta do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Auxiliar Administrativo PPGCS
Diana Ghisi Daniel
Secretária

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências-NEUROLAB do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde-PPGCS.

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Beatriz e Lorenzo, por me fazerem sentir a pessoa mais especial do mundo, por iluminarem o meu caminho, por serem a razão a minha existência. Vocês são o valor do meu trabalho, a minha vontade de aprender, a minha força. São o meu impulso, o meu reflexo. São meu ouvido aguçado enquanto durmo, minha pressa de levantar da cama, a minha espera de bom dia. São a paz quando estão nos meus braços, a emoção quando me olham. São o meu ontem, o meu hoje, o meu amanhã. São a minha vontade, a inspiração, a poesia. A lição, o dever. A minha dedicação. A minha oração. A minha gratidão. O meu amor mais puro e sincero. A minha vida! Amo vocês!!

“ Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial na minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente em todas as horas, por ter me guiado e iluminado o meu caminho e colocado em minha caminhada pessoas muito especiais sem as quais eu jamais teria conseguido concluir este trabalho.

Aos meus pais Laênio e Carolina, meus grandes incentivadores, por serem meu porto seguro. Suas presenças significam segurança e a certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Obrigada por terem me ensinado através do exemplo, os verdadeiros valores da vida. A vocês além do agradecimento desta conquista dedico a minha vida.

Ao Giulliano, meu marido, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigado pelo carinho cuidado, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria do meu dia a dia.

Aos meu irmãos, Andressa, Graziella e Tiago que durante este trabalho não mediram esforços em me ajudar. Amo vocês!!

A minha avó Padina e ao meu avô Marqueto (*in memoriam*), pelo amor e apoio que sempre me deram e por toda a força espiritual direcionada a mim.

A Professora Josiane, minha orientadora, que não mediu esforços para me ajudar. Obrigado por acreditar em mim quando eu achei difícil acreditar. Por trás dessa função que você desempenha exemplarmente, está um ser humano ímpar, admirável, com um grande coração e que foi além das suas obrigações para me auxiliar. Sua ética, generosidade, amizade e humildade são atitudes e qualidades que se fazem presentes nas suas ações e que ficarão de exemplo e inspiração para mim. Sempre terei uma enorme dívida de gratidão por tudo que fez por mim. Muito Obrigada!

A Cenita, amiga muito especial, generosa e companheira. Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam te agradecer com justiça e com o devido merecimento. Sua ajuda e seu apoio foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Apenas posso me expressar através da limitação de meras palavras, e com elas prestar a você este humilde, mas sincero, agradecimento. Muito Obrigada!

A grande amiga Alê que tenho um carinho enorme, que esteve comigo nas horas boas e também nas horas difíceis e confusas me dando apoio e me incentivando a seguir em frente. Obrigada por ser uma amiga e tanto para mim. Amigos verdadeiros são para sempre, e mesmo quando estão longe, permanecem junto ao coração, sentirei muito sua falta.

A Ana Carolina, mais uma grande amiga que fiz neste mestrado. Obrigado por sua amizade, pela força que você me dá e pela compreensão que tem por mim. Obrigado por você ser essa pessoa que você é. E obrigado por estar sempre disposta a me ajudar. Sem o seu auxílio jamais teria conseguido. Admiro demais você.

As minhas amigas do Neurolab, Fran, Mi e Tati por toda a atenção e dedicação dirigidas ao meu trabalho, vocês são muito especiais. Muito Obrigada!!

A Lara, Jadne, Jesiel, Sabrina, enfim a todos os colegas, professores e funcionários que estiveram comigo nesta jornada que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

A vida é feita de caminhos que se cruzam, uns para sempre e outros apenas por algum tempo. Não importa se agora os nossos tomarão rumos diferentes, o que tem verdadeiro valor é tudo o que conquistamos enquanto estivemos juntos.

Foi um prazer trabalhar com todos vocês e aprender a cada dia algo de novo. Levarei cada um de vocês no meu coração com uma gratidão enorme pela oportunidade e pela satisfação de poder ter convivido com cada um de vocês.

Que o sucesso continue ao lado de cada um de vocês e a felicidade seja uma companheira assídua, assim como foi minha, durante todo o período em que estive com vocês.

Que Deus abençoe a todos.

RESUMO

O envelhecimento acarreta um declínio funcional que atinge a expressiva maioria dos organismos vivos. A deficiência ou suplementação de vitaminas, como o ácido fólico (AF) durante a gestação pode interferir no processo de envelhecimento. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar parâmetros de memória e inflamação na prole adulta e idosa de ratas com deficiência ou suplementação de AF na gestação. Foram utilizadas 50 ratas e 50 ratos Wistar para acasalamento. Após, as ratas prenhas permaneceram durante 28 dias de gestação com diferentes dietas: dieta AIN 93 ou controle, dieta deficiente em AF, dieta AIN 93 + AF 5 mg/kg, dieta AIN 93 + AF 10 mg/kg e dieta AIN 93 + AF 50 mg/kg. A prole fêmea de todos os grupos experimentais quando jovens adultas (2 meses) e somente a prole de ratas com AIN 93, deficientes de AF e AIN 93 + AF 10mg/kg, quando idosas (18 meses) foram submetidas ao teste de habituação ao campo aberto e córtex e hipocampo foram utilizados para as análises bioquímicas. Os resultados mostram que a deficiência de AF no período gestacional, não altera a memória de habituação na prole adulta. Na prole com 18 meses, o grupo controle e o grupo deficiente em AF apresentaram dano na memória de habituação. Porém, a prole com 18 meses do grupo AF 10 mg/kg apresentou proteção contra este efeito. O AF 50 mg/kg induziu dano na memória de habituação na prole jovem. Foi observado também que os níveis de TNF- α e IL-1 β foram aumentados no hipocampo da prole com 18 meses do grupo controle e com deficiência de AF. No grupo AF 10 mg/kg não foi observado este aumento. A prole com 2 meses do grupo AF 50 mg/kg apresentou redução dos níveis de IL-1 β no hipocampo. Não foram observadas alterações nos níveis de TNF- α e IL-1 β no córtex frontal da prole. Além disso, no córtex frontal, foi observado que a prole com 2 meses do grupo AF 10 mg/kg mostrou aumento da IL-4 e no grupo AF 50 mg/kg ocorreu redução da IL-4. No córtex frontal de animais idosos foi observado redução da IL-4 no grupo controle, já no grupo AF 10 mg/kg, foi observado aumento desta interleucina. No hipocampo, a prole com 2 meses do grupo deficiente e do grupo AF 50 mg/kg apresentaram redução dos níveis de IL-4. Já a prole jovem do grupo AF 10 mg/kg apresentou aumento dos níveis de IL-4. Juntos, os resultados indicam que a suplementação com AF durante a gestação pode proteger a prole idosa contra o dano cognitivo do envelhecimento,

que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β e aumento de IL-4 em tecido cerebral. Também, foi observado que a suplementação de ratas com altas doses de AF na gestação pode provocar dano cognitivo na prole com idade adulta, podendo ser explicado, pelo menos em parte, pela redução dos níveis de IL-4 no córtex frontal e hipocampo destes animais.

Palavras-chave: Envelhecimento. Memória de habituação. Processo inflamatório. Ácido fólico. Citocinas.

ABSTRACT

Aging causes a functional decline that reaches the most expressive living organisms. The vitamin deficiency or supplementation, like folic acid (FA) during the pregnancy can interfere in aging process. Therefore, the aim of this study was to evaluate the memory parameters and inflammation in adult and old offspring of Wistar rats with FA deficiency or supplementation in pregnancy. 50 female and male *Wistar* rats were used for mating. After, the female rats pregnant remained for 28 days of pregnancy with different diet: AIN 93 diet or control, FA deficiency diet, AIN 93 diet + FA 5 mg/kg, AIN 93 diet + FA 10 mg/kg and AIN 93 diet + FA 50 mg/kg. The young adult (2 months) female offspring of all experimental groups and only the older (18 months) female offspring of rats with AIN 93 diet, FA deficiency diet and AIN 93 diet + FA 10mg/kg were subjected to open field habituation task and frontal cortex and hippocampus were used for biochemical analysis. The results show that the deficiency of FA on the gestational period, does not change the memory of habituation in adult offspring. In the offspring with 18 months, the control and FA deficiency group showed damage in the habituation memory. However, the 18 month old offspring of FA 10 mg/kg group showed protection against this effect. The FA 50 mg/kg induced damage in habituation memory in young offspring. Also, It was observed that TNF- α and IL- β levels were increased in the hippocampus of 18 month old offspring of control and FA deficiency group. In the FA 10 mg/kg was not observed this increase. The 2 month old offspring of FA 50 mg/kg group presented reduction of IL- β level in the hippocampus. It was not observed alteration of TNF- α and IL-1 β in the offspring frontal cortex. Moreover, in the frontal cortex, it was observed that in 2 month old offspring of FA 10 mg/kg group showed increase of IL-4 and in the FA 50 mg/kg occurred reduction of IL-4. In the frontal cortex of old animals was observed reduction of IL-4 in the control group, already in the FA 10 mg/kg group, it was observed increase this interleukin. In the hippocampus, the 2 month old offspring of FA deficiency and FA 50 mg/kg group presented reduction of IL-4 levels. Already the young offspring of FA 10 mg/kg group presented increase of IL-4 levels. Altogether, the results indicated that FA supplementation during pregnancy can protect the old offspring against the cognitive damage of aging, that can explain, at least in part, by reduction of TNF- α and IL-1- β

levels and increase of IL-4 in brain tissue. Also, it was observed that rats supplemented with high dose of FA in the pregnancy can provoke cognitive damage in the young offspring, which can be explained, at least in part, by reduction of IL-4 levels in the frontal cortex and hippocampus.

Keywords: Aging. Habituation memory. Inflammatory process. Folic acid. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho experimental prole jovem adulta.....	52
Figura 2: Desenho experimental prole idosa.....	54
Figura 3: Efeito na prole adulta e idosa da deficiência ou suplementação de ácido fólico (AF) de mães durante a gestação na memória de habituação.....	57
Figura 4: Efeito na prole adulta e idosa da deficiência ou suplementação de ácido fólico (AF) de mães durante a gestação nos níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α).....	58
Figura 5: Efeito na prole adulta e idosa da deficiência ou suplementação de ácido fólico (AF) de mães durante a gestação nos níveis de interleucina 1 β (IL-1 β).....	59
Figura 6: Efeito na prole adulta e idosa da deficiência ou suplementação de ácido fólico (AF) de mães durante a gestação nos níveis de interleucina 4 (IL-4).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais maternos: fêmeas durante a fase de gestação e lactação.....	49
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AF – Ácido fólico

AIN 93 - American institute of nutrition-93 (do inglês)

CRP – Proteína c-reativa

DCNT - Doenças crônicas não transmissíveis

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EUA – Estados Unidos da América

WHO – World health organization

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística

IL - Interleucina

SAM - S-adenosilmetionina

SBNeC - Sociedade brasileira de neurociências e comportamento

SNC – Sistema nervoso central

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	33
1.1 ENVELHECIMENTO.....	33
1.2 ENVELHECIMENTO E MEMÓRIA.....	35
1.3 ENVELHECIMENTO E PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	38
1.4 DEFICIÊNCIAS NUTRICIONAIS.....	40
1.5 DEFICIÊNCIA DE ÁCIDO FÓLICO.....	41
1.6 DEFICIÊNCIA DE ÁCIDO FÓLICO E ENVELHECIMENTO.....	43
1.7 JUSTIFICATIVA.....	45
2 OBJETIVOS.....	47
2.1 OBJETIVO GERAL.....	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	48
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	48
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	48
3.3.1 Ratas Wistar durante a fase de gestação e lactação.....	48
3.3.2 Composição das rações (dietas) especiais oferecidas às ratas <i>Wistar</i>	49
3.3.3 Suplementação de AF para as ratas <i>Wistar</i> durante a fase de gestação e lactação.....	50
3.3.4 Controle de Peso Gestacional e consumo de ração das Ratas <i>Wistars</i>	51
3.3.5 Prole Fêmea Jovem Adulta de ratas <i>Wistar</i>	52
3.3.6 Prole Fêmea Idosa de ratas <i>Wistar</i>	53
3.4 TESTE MEMÓRIA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO.....	54
3.5 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	55
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	55
3.6.1 Avaliação dos níveis de citocinas.....	55
3.7 ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	55
4 RESULTADOS.....	56
4.1 MEMÓRIA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO.....	56
4.2 NÍVEIS DE TNF- α	57
4.3 NÍVEIS DE IL-1 β	58
4.4 NÍVEIS DE IL-4.....	59
5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

ANEXOS.....	85
Anexo A: Carta de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	86
Anexo B: Tabela de composição nutricional da Dieta AIN 93 ou controle.....	87
Anexo C: Tabela de composição nutricional da Dieta deficiente em ácido fólico.....	88
Anexo D: Tabela de composição nutricional da ração comum (padrão) oferecida aos animais no Biotério.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento pode ser amplamente definido como um declínio funcional dependente do tempo que afeta a maioria dos organismos vivos, o qual tem atraído a imaginação e a curiosidade através da história da humanidade (López-Otín et al., 2013). Portanto, do ponto de vista conceitual, o envelhecimento pode ser considerado um processo no qual ocorrem transformações físicas, psíquicas, biológicas e sociais (Zhang et al., 2014), apresentando uma deterioração progressiva dos mecanismos de homeostase do cérebro em geral, acompanhado de declínio cognitivo. Logo, o envelhecimento é um processo biológico universal e inevitável (Bishop et al., 2010; Morrison e Baxter, 2012). Ao mesmo tempo pode ser entendido como uma etapa do processo natural da vida, cuja característica principal é a acentuada redução da capacidade de adaptação e conseqüente diminuição da expectativa de vida. Esta condição torna o indivíduo mais vulnerável e predisposto a morbidades e mortalidade (Borba et al., 2012).

No entanto, os avanços em tecnologia, cuidados de saúde e nutrição, levaram a um aumento significativo na expectativa de vida dos seres humanos e animais. Segundo a WHO (2015), a proporção de pessoas com mais de 60 anos está aumentando e deve chegar a 22% da população total mundial em 2050. Países de baixa e média renda vão experimentar a mudança demográfica mais rápida e dramática. A França, por exemplo, levou 100 anos para a parcela da população com 65 anos ou mais dobrar 7-14%. Em contraste, países como o Brasil e a China com menos de 25 anos alcançarão o mesmo crescimento. Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2002), a população de idosos com idade acima de 75 anos é a que mais cresce no Brasil. Dados mais recentes indicam que a faixa etária de 80 anos ou mais é composta por 2.935.585 pessoas (IBGE, 2011), representando 14% da população idosa brasileira. Também indicam que a população de idosos apresenta uma taxa de crescimento acima da população total, evidenciando que o Brasil está se tornando um país de terceira idade (Tamai, 1997). Estima-se que a partir de 2030, o total de idosos ultrapassará o número de jovens com idades entre 15 e 29 anos, caso as taxas de crescimento se mantenham em tal dinâmica (Ipea, 2010).

Essa alteração no perfil etário da população altera o perfil de saúde e as doenças degenerativas crônicas, as incapacidades físicas e mentais tendem a ser mais percebidas (Fagundes et al., 2011). Apesar dos grandes avanços científicos nessa área, os mecanismos moleculares que representam a interface entre envelhecimento e patologias neurodegenerativas continuam obscuros. Existe na literatura uma proposta de que alterações celulares, provocadas por fatores ambientais e ou genéticos, os quais acontecem ao longo do envelhecimento aceleram a progressão de processos neurodegenerativos com disfunções cognitivas (Troulinaki e Tavernarakis, 2005).

Entre as teorias biológicas que buscam explicar o processo de envelhecimento, devem-se ressaltar as teorias estocásticas e sistêmicas. As teorias estocásticas consideram que a perda de funções do organismo é resultado de falhas no processo de reparo de danos em função do acúmulo de macromoléculas defeituosas (Jeckel-Neto e Cunha, 2006). A exemplo disso, sugere-se a teoria do estresse oxidativo e de radicais livres, os quais possuem uma tendência de aumentar com o avanço da idade e desencadeiam, possivelmente, diversos processos patológicos no organismo (Syslová et al., 2014). Em contrapartida, as teorias sistêmicas supõem alterações de maneira geral nos diversos sistemas do organismo (Jeckel-Neto e Cunha, 2006).

Segundo Fachine e Trompieri (2012), o processo de envelhecimento varia entre os indivíduos, sendo que para alguns ocorre de forma mais lenta, enquanto para outros é muito rápido. Muitos são os fatores que incidem sobre essas variações, tais como o estilo de vida, as condições socioeconômicas e mesmo as doenças crônicas que cada indivíduo apresenta. Portanto, o envelhecimento pode ser descrito como primário, secundário e terciário, sendo que o primário encampa as características normais do envelhecimento, decorrentes dos fatores genéticos de cada indivíduo. O envelhecimento secundário é também chamado de patológico, já que nele ocorrem doenças que não se confundem com o processo de envelhecimento de forma geral. O envelhecimento terciário abrange as perdas físicas e cognitivas acentuadas, causadas pelo envelhecimento em associação com patologias que decorrem da idade (Jeckel-Neto e Cunha, 2006).

Um estudo indica que estas alterações cognitivas no processo de envelhecimento, encontram-se entre as principais queixas dos idosos (Parente, 2006). É essencial destacar que a demência vem crescendo consideravelmente em todo o mundo, sendo extremamente comum em

indivíduos idosos. Fator este que aumenta a importância do conhecimento sobre a condição, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado, por meio do monitoramento dos sintomas e de sua evolução em cada indivíduo. Não se pode ignorar o fato de que o envelhecimento populacional atua diretamente sobre o sistema de saúde pública. Assim, o acompanhamento dos idosos, visando identificar mudanças cognitivas, é essencial para que as doenças associadas ao envelhecimento possam ser diagnosticadas e tratadas de forma precoce. Desta forma, evitando que alcancem o patamar de evolução no qual esses indivíduos perdem sua identidade e sua capacidade de realizar mesmo as tarefas mais simples de seu cotidiano, mas que asseguram uma percepção de satisfação e utilidade sobre eles próprios (Trindade et al., 2013).

Portanto, apesar das teorias do envelhecimento estar bem estabelecidas, o conhecimento sobre sua etiologia, bem como da etiologia das doenças relacionadas ao envelhecimento, é ainda limitado, em função da característica multifatorial envolvida no desencadeamento dos mesmos (da Costa et al., 2016). Existem várias teorias que buscam explicar as alterações fisiológicas decorrentes do envelhecimento. Evidências experimentais têm sugerido que as modificações do microambiente do encéfalo senescente estão associadas ao aumento da reatividade microglial, inflamação crônica (Siqueira et al., 2005; Jurgens e Johnson, 2010) e declínio cognitivo (Weaver et al, 2002; Yaffe et al., 2004).

1.2 ENVELHECIMENTO E MEMÓRIA

A memória é uma das mais importantes funções cognitivas do homem. Pode-se descrevê-la como esta incrível habilidade de armazenar informações e conhecimentos sobre o indivíduo e o mundo que o cerca. Ela é a base para o desenvolvimento da linguagem, do reconhecimento das pessoas e dos objetos que encontra-se todos os dias, para saber quem é e para ter a consciência da continuidade da vida (Freitas, 2006).

O processo natural de envelhecimento é caracterizado pelo declínio de diferentes funções cognitivas, como a memória, a aprendizagem e as funções executivas. Em relação à memória, no decorrer dos anos, ocorrem alterações tanto na aquisição quanto na evocação de novas informações (Quevedo et al., 2006). Penna (2001) enfatiza que, a noção de esquecimento está vinculada à experiência de tempo e da capacidade

de ordenação e localização das informações evocadas.

A memória e a aprendizagem andam juntas sempre, mesmo no envelhecimento, pois novas informações e rotinas são inseridas na vida de cada indivíduo e elas devem ser armazenadas para uso posterior. Dentre as memórias mais prejudicadas e que afetam de forma importante a qualidade de vida dos idosos está a memória episódica, a qual depende do resgate e reconhecimento de informações, bem como da organização de novas estratégias (Avila e Borrino, 2008).

A memória explícita inclui memória episódica, que envolve a lembrança consciente de eventos e experiências, e a memória semântica (Tulving, 1987). A memória episódica permite que se pense de volta no tempo subjetivo o que Tulving chama de viagem mental no tempo (Tulving, 2002) e normalmente evoca uma "Lembro-me" resposta. Por ser distintamente humana, é a forma mais avançada de memória e é ontogeneticamente a última a se desenvolver. Esta também parece ser a mais suscetível a danos cerebrais e os mais afetados pelo envelhecimento normal.

O estudo Betula, um projeto longitudinal de 10 anos examinando memória e saúde em 1000 pessoas entre as idades de 35 e 80 anos, mostrou uma diminuição marcante no desempenho da memória episódica com a idade (Nilsson et al., 1997), o que é consistente com o resultado de outro estudo (Birren et al., 2006). Estas alterações são provavelmente por causa de disfunção relacionada com o envelhecimento do hipocampo e do córtex, uma que a memória explícita é largamente codificada no hipocampo, embora outras regiões do cérebro, tais como várias áreas neocorticais, também são considerados envolvidas (Grady et al., 2003).

Dificuldades com a recordação livre e ordenação temporal em idosos têm demonstrado estar associadas a déficits na codificação e recuperação da informação (Daum et al., 1996). Os lobos frontais desempenham um papel importante na codificação de informações (Fletcher et al., 1998; Dolan e Fletcher, 1997). Estudos de ressonância magnética funcional têm correlacionado o desempenho da memória episódica pobre em pessoas idosas com reduções na ativação do lobo frontal esquerdo durante a codificação inicial da memória (Stebbins et al., 2002).

Park e Schwarz (2000) identificam as teorias que, historicamente, têm sido mais discutidas como potenciais mediadores das diferenças do envelhecimento no funcionamento cognitivo e podem alterar a eficiência

do processamento, entre eles são: (1) diminuição da velocidade de processamento; (2) diminuição da memória de trabalho; (3) diminuição do controle inibitório e; (4) diminuição da função sensorial (principalmente a diminuição da acuidade auditiva e visual).

Considerando o efeito da idade em cada etapa da memória episódica, a literatura tem sido controversa. Alguns autores defendem que os adultos mais velhos recuperam menos informações comparativamente com os jovens devido às dificuldades na fase de codificação. Isto deve-se a uma lentificação do processamento mental (Park e Festini, 2016), a utilização ineficaz de estratégias de codificação (por exemplo, mnemônicas ou repetição sub-articulatória da informação) ou a um compromisso atencional que dificulta a captação da informação apresentada (Glisky, 2007).

Logo, as alterações sensoriais (Malloy-Diniz et al., 2008; Correa, 2008), alterações de atenção (Kallus et al., 2005) e alterações no lobo frontal (Possin et al., 2009) no envelhecimento podem alterar a eficiência da memória e da aprendizagem.

É importante salientar ainda a existência da relação entre as alterações dendríticas e os efeitos pós-sinápticos dos neurotransmissores. Alterações neuronais que ocorrem durante o envelhecimento tem um profundo efeito sobre a distribuição de neurofilamentos e impacto importante sobre parâmetros colinérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos e glutamatérgicos. Alterações nesses sistemas modificam os mecanismos subjacentes aos processos cognitivos predispondo a disfunções (Gazzaley et al., 1996; Morrison et al., 1997; Hof et al., 2002).

No geral, o envelhecimento em seu desenvolvimento normal está associado com uma diminuição relativamente seletiva na memória episódica e na função executiva, enquanto memórias tanto semânticas e implícitas são poupadas. É importante esclarecer que a memória episódica requer a atividade do lobo frontal para a codificação e recuperação, de modo que a disfunção do lobo frontal parece desempenhar um papel particularmente importante no declínio cognitivo com o envelhecimento normal. É importante notar que o declínio cognitivo relacionado com a idade tem implicações importantes para os idosos, porque a cognição é fortemente preditivo para demência (McGuire et al., 2006), e o declínio no funcionamento executivo parece especialmente relevante nesse sentido (Cahn-Weiner et al., 2002; Royall et al., 2005; Johnson et al., 2014).

O prejuízo de memória é o evento clínico de maior magnitude para o diagnóstico de demência. Estudos epidemiológicos apontam que os idosos que apresentam declínio da capacidade cognitiva tendem a desenvolver doença de Alzheimer de forma mais frequente, com ênfase nos idosos com déficit de memória episódica (Trindade et al., 2013).

Outros estudos também apontam que a neuroinflamação pode ser um mecanismo subjacente importante no declínio cognitivo em idosos, conforme demonstrado por evidências de pesquisas sobre a associação entre os níveis sistêmicos de marcadores inflamatórios para disfunção cognitiva relacionada com a idade (Cunningham, 2011; Park e Festini, 2016; Yin et al., 2016).

1.3 ENVELHECIMENTO E PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório é um mecanismo de proteção e permite que o corpo se defenda de agentes agressores, como também a remoção de células necróticas e outros fragmentos celulares, assim restaurando tecidos e órgãos. Este processo é sempre um evento desejável que consiste na resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção que induz uma sequência de eventos coletivamente conhecida como resposta inflamatória. Essa complexa reação do sistema imune inato em tecidos vascularizados envolve: vasodilatação (arteriolar e venular); aumento de permeabilidade vascular; edema e extravasamento de plasma e proteínas; acúmulo e ativação de leucócitos no sítio inflamado. Por outro lado, pode acontecer que ao fazer esta resposta aos microorganismos invasores, poderá tornar incontrolável e causar danos a tecidos saudáveis (Tilley et al., 2001; Carvalho e Carvalho, 2007). Diversos estudos têm proposto que as disfunções inflamatórias estão associadas a transtornos psiquiátricos e neurodegeneração em modelos animais e pacientes (Theoharides e Zhang, 2011; Onore et al., 2012).

As citocinas são peptídeos produzidos e liberados pelas células imunes, capazes de interferir no metabolismo de sistemas de neurotransmissores, nas atividades neuroendócrina e neuronal, na regulação do crescimento e da proliferação das células da glia (Barbosa et al., 2009). As citocinas são produzidas por inúmeros tipos de células no sítio da lesão, bem como por células do sistema imunológico, através da ativação de proteoquinases ativadas por mitógenos (Oliveira et al., 2011). Normalmente, as citocinas atuam no organismo a fim de combater diversos patógenos. No sistema imune elas reconhecem

partículas invasoras, bem como participam de respostas adaptativas ou reações homeostáticas (Avitsur e Yirmiya, 1999; Aderem e Ulevitch, 2000).

Evidências apontam que, os aspectos genéticos influenciam a produção de fatores inflamatórios e de que, em idosos, ocorre um processo inflamatório basal característico do envelhecimento e influenciado pela genética, denominado *inflammaging* (Mishto 2003; Giunta 2006; Goto 2008; Tonet et al., 2008; Macedo et al., 2009; Wagner et al., 2016; Minciullo et al. 2016). Há a necessidade de melhor compreender estes fenômenos quando associados. No *inflammaging*, identifica-se a elevação dos níveis de citocinas inflamatórias como, por exemplo, a interleucina-6 (IL-6), proteína C reativa (CRP), IL-1 β e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Franceschi et al., 2000; Sakuma e Yamaguchi, 2013; Minciullo et al. 2016). O *inflammaging* pode modular o fenótipo e a reatividade da microglia e contribui para uma inflamação de baixo grau do cérebro (Franceschi et al., 2000; von Bernhardi et al., 2010; Wagner et al., 2016).

Alguns estudos relacionam marcadores de inflamação à cognição. A maior parte destes estudos são baseados em dados utilizando o soro de idosos para avaliar os níveis de IL-6 e os níveis de CRP. A relação é consistente em grandes estudos longitudinais, associando maior CRP e níveis IL-6 com declínio cognitivo (Weaver et al., 2002; Yaffe et al., 2000). A ativação microglial também tem sido associada com doenças do cérebro (Najjar et al., 2013). A Microglia é uma célula imune residente do sistema nervoso central (SNC) ativada em resposta à lesão cerebral (Stertz et al., 2013). A ativação microglial pode induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina IL -1 β , IL-6 e TNF - α , levando a lesão e perda neuronal (Zhao et al., 2014; Réus et al., 2015).

O envelhecimento é acompanhado pela senescência das células da microglia, as quais perdem a função protetora e se tornam mais suscetíveis à ativação. Entre os estímulos que podem ativá-las encontram-se a deposição anormal do peptídeo β -amilóide e a forma patogênica da α -sinucleína que aparecem com o avançar da idade (Williams et al., 1992).

Há evidências de que mecanismos inflamatórios estão envolvidos na patogênese de doenças neurodegenerativas do idoso e riscos de comprometimento cognitivo, sendo que, já foi encontrada a PCR dentro e em torno de placas beta-amilóide nos cérebros dos pacientes com

demência. Também, demonstra evidências de ser um sensível marcador da inflamação sistêmica de baixo grau, aumenta as concentrações séricas de PCR, sendo associada com diminuição da cognição, aumento do risco de demência vascular e doença de Alzheimer (Komulainen et al., 2007).

1.4 DEFICIÊNCIAS NUTRICIONAIS

A alimentação dos indivíduos demanda acentuada qualidade nutricional para que as necessidades de nutrientes e energia do organismo sejam atendidas, de acordo com sexo, idade, padrão de atividades físicas e medidas corporais que apresentam. Quando se define uma dieta específica para um indivíduo, suas características precisam ser consideradas para que a definição adequada de nutrientes seja preconizada (Hickson, 2006; Padovani et al., 2006; Wells e Dumbrell, 2006). Nos países em desenvolvimento, a desnutrição vem sendo percebida de forma muito acentuada, considerando-se que o acesso a uma alimentação saudável, equilibrada e livre de agentes que causam prejuízos à saúde ainda é muito limitado. No geral, existe a preferência pelo consumo elevado de calorias, sem preocupações com os impactos desse tipo de alimentação sobre a saúde em médio e longo prazo (Acuña e Cruz, 2004; Müller e Krawinkel, 2005).

Como novos conhecimentos surgem na área de forma frequente, estes precisam ser considerados sempre que se destaca uma nova dieta ou quando se procede da revisão de uma dieta em andamento, já que tanto a deficiência quanto o excesso de consumo de alguns nutrientes podem ser prejudiciais e trazer efeitos adversos ao organismo dos indivíduos. A desnutrição pode ser caracterizada como um estado do indivíduo que recebe nutrientes em quantidade insuficiente ou inadequados. Essa condição pode ser causada pela falta de um ou mais nutrientes (subnutrição), ou pelo excesso de nutrientes (supernutrição). De forma geral, a desnutrição encampa o estado de subnutrição, cujo uso é mais comum na literatura e, assim, trata-se de um conceito mais disseminado e aceito entre diferentes autores que estudam o tema (Acuña e Cruz, 2004; Padovani et al., 2006; Hickson, 2006).

A subnutrição em pacientes idosos costuma ser diagnosticada de forma falha e muitos médicos afirmam que necessitam de mais informações e preparação a respeito da condição nutricional em pacientes idosos (Wells e Dumbrell, 2006, Padovani et al., 2006). Quase

dois terços das internações em geral e agudas em hospitais são de pessoas com mais de 65 anos, enquanto pessoas com mais de 75 anos tendem a ficar internadas por mais tempo. Muitos pacientes idosos têm maior risco de subnutrição quando comparados com outras populações adultas. Estima-se que entre 2% e 16% de indivíduos institucionalizados apresentam deficiência nutricional no que tange proteínas e calorias. Se as deficiências de minerais e vitaminas forem consideradas na estimativa, a subnutrição em idosos acima de 65 anos pode ser maior do que 35% (Hickson, 2006; Wells e Dumbrell, 2006; Sousa e Guariento, 2009).

É preciso compreender que a desnutrição não é um resultado inevitável do envelhecimento, porém, muitas mudanças associadas ao processo de envelhecimento podem levar à desnutrição. Por exemplo, o envelhecimento está associado com quedas na acuidade do paladar e olfato, deterioração da saúde dentária e redução das atividades físicas, o que pode afetar a absorção de nutrientes. Qualquer mudança na absorção de nutrientes pode levar a desnutrição, com potencial de causar consequências sérias (Hickson, 2006; Padovani et al., 2006; Sousa e Guariento, 2009).

1.5 DEFICIÊNCIA DE ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico (AF) trata-se de uma vitamina, também conhecida como vitamina B9, presente em diferentes alimentos e que passa por modificações em sua estrutura quando exposta por tempo prolongado ao oxigênio do ar ou temperaturas elevadas, de modo que sua ação no organismo também poderá ser impactada. O AF participa de processos essenciais do corpo, como a formação e multiplicação de células, inclusive as células sanguíneas, atua diretamente sobre as células de defesa do organismo e na formação de proteínas (Kruman et al., 2002; Reynolds, 2002; Uehara e Rosa, 2010).

O folato pode ser obtido através do consumo de folhas verdes, legumes, feijões, frutas cítricas, fígados e grãos integrais. Destaca-se que diferentes reações bioquímicas se fazem necessárias para que o folato da dieta ou o AF dos suplementos sejam convertidos na forma biologicamente ativa. De 85% a 95% do AF são realmente absorvidos, enquanto a absorção do folato da dieta alcança apenas 50%. O AF é tão relevante para a saúde dos indivíduos, que os governos de diferentes países vêm definindo a obrigatoriedade da fortificação da farinha com

AF e, em muitos casos, estudos conduzidos após o estabelecimento dessa medida demonstram que uma série de condições relacionadas à saúde de indivíduos de diferentes idades foram alteradas de forma positiva (Duthie, 1999, Jacques et al., 1999; Kruman et al., 2002; Hickson, 2006).

O AF encontrado nos alimentos apresenta-se sob a forma de poliglutamato, devendo ser convertido em monoglutamato antes de sua absorção pelo organismo. Na forma de suplemento, o AF é mais estável e já se encontra na forma adequada para a absorção, que ocorre rapidamente. Nesse sentido, a biodisponibilidade de AF para a absorção intestinal é de 60%, enquanto no caso de suplementos ou alimentos enriquecidos ela chega a 98% (De Wals et al., 2007; Uehara e Rosa, 2010).

Estudos sobre dados clínicos e epidemiológicos apontam para o fato de que pessoas com baixos níveis de ácido fólico e elevados níveis de homocisteína apresentam maior risco de desenvolver a doença de Alzheimer, porém, o mecanismo que leva a essa ocorrência ainda não se encontra totalmente esclarecido. A deficiência de AF em humanos vem sendo relacionado com a anemia megaloblástica, defeitos no tubo neural de neonatos e problemas cardíacos. Pois o AF é crucial para a síntese e reparação normal do DNA. A deficiência de AF pode causar um desequilíbrio nos precursores de DNA, falta de incorporação de uracila ao DNA, bem como quebra dos cromossomos (Duthie, 1999; Kruman et al., 2002; Reynolds, 2002; De Wals et al., 2007; Santos e Pereira, 2007).

A deficiência de AF também pode estar relacionada ao desenvolvimento de câncer, com maior incidência no colo do útero, pulmões, mama e colorretal (Duthie, 1999; Persad et al., 2002; De Wals et al., 2007). Além disso, a deficiência de AF pode estar relacionada ao desencadeamento de depressão e demência tipo doença de Alzheimer (Araújo et al., 2015). Também foi observado ser protetor em modelos animais de depressão, esquizofrenia e transtorno bipolar e meningite (Brocardo et al., 2008a, b; Brocardo et al., 2009; Brocardo et al., 2010; Budni et al., 2012a, b; Budni et al., 2013; Barichello et al., 2015; Zugno et al., 2016).

O AF é tão relevante para o organismo, que cada vez mais estudos destacam a necessidade da complementação do mesmo na alimentação de indivíduos de todas as idades, inclusive idosos. A relação entre a condição do estado do folato na mãe e o risco de fechamento inadequado do tubo neural já foi bem esclarecida. O tratamento com 400

ug ou mais de ácido fólico reduz significativamente os riscos desses defeitos (Reynolds, 2002; Andrès et al., 2004; Santos e Pereira, 2007). Portanto, quando os folatos não são consumidos em quantidade suficiente pode ocorrer o envelhecimento cerebral, tendo consequência sobre o humor e as funções cognitivas dos indivíduos. A associação entre deficiência de folato e depressão e demência é bastante clara, com ênfase em pacientes epiléticos, neurológicos, psiquiátricos, geriátricos e psicogeriátricos (Reynolds, 2002; Santos e Pereira, 2007). Nesse sentido, mulheres que planejam engravidar devem receber doses diárias de AF, seguindo as recomendações médicas adequadas, como forma de evitar a ocorrência de defeito no tubo neural em seus filhos e outras consequências, sendo que o período mínimo recomendado seria de dois meses antes de engravidar e durante o primeiro trimestre da gestação (De Wals et al., 2007; Santos e Pereira, 2007).

Nos Países Baixos não existe permissão para a fortificação de alimentos com AF, em função da preocupação com a população idosa, já que o AF em altas concentrações poderia mascarar os sintomas da falta de vitamina B-12 associados com anormalidades neurológicas, levando a um atraso no diagnóstico e potencial progressão de anormalidade neurológicas resultantes dessa deficiência (Jacques et al., 1999; Andrès et al., 2004).

1.6 DEFICIÊNCIA DE ÁCIDO FÓLICO E ENVELHECIMENTO

A deficiência de AF pode facilitar diversas doenças relacionadas ao envelhecimento, tais como doenças coronarianas, derrame e diferentes tipos de câncer (Van Ort et al., 2003). A deficiência de AF dificulta o reparo do DNA e, assim, pode levar a danos acentuados no DNA de células mitóticas. A hiperhomocisteinemia é uma consequência da deficiência de AF e contribui para a patogênese de doenças cardiovasculares, derrame e possivelmente doença de Alzheimer e Parkinson. A deficiência de vitamina B12 ocorre de forma frequente entre idosos, porém, muitas vezes não é reconhecida devido ao fato de que as manifestações clínicas são sutis. Porém, a condição é potencialmente grave, principalmente da perspectiva neuropsiquiátrica e hematológica. As causas dessa deficiência costumam ser absorção insuficiente de cobalamina dos alimentos (>60% dos casos), anemia perniciosa (15% a 20% dos casos), dieta inadequada e absorção falha do

organismo (Van Ort et al., 2003; Andrés et al., 2004; Uehara e Rosa, 2010; Coussirat, 2010).

Diante disso, percebe-se que a deficiência nutricional entre os idosos tende a ser elevada e grave, não sendo possível citar apenas um tipo de nutrientes, mas diversos deles como sendo necessários, porém consumidos em quantidades inadequadas ou em casos em que o organismo não consegue proceder da correta absorção. Assim, os cuidados e a atenção aos fatores nutricionais dos idosos precisam ser acentuados e contínuos (Eussen et al., 2006; Uehara e Rosa, 2010; Walker et al, 2012).

As causas do deficiência do AF são diversas (Araújo et al., 2015). Entre ela a principal envolve a absorção intestinal reduzida desta vitamina (de Benoist, 2008), que pode ser uma consequência da atrofia gástrica, que é uma inflamação crônica do estômago que afeta entre 20-50% do indivíduos com idade acima de 60 anos. Isso induz atrofia gástrica com consequente redução da secreção de ácido clorídrico (Allen, 2009; Selhub et al., 2000). Outras doenças podem afetar a estrutura e função do estômago ou intestino delgado e são muito prevalentes em idosos contribuindo para a deficiência de AF, como: doença inflamatória do intestino, diverticulose, doença celíaca ressecção intestinal ou gástrica (Hughes et al., 2013; Robins Wahlin et al., 2001). Outras causas de deficiência de AF em idosos é o declínio da função sensorial e apetite (Hughes et al., 2013; Reynolds, 2006), disfagia e mastigação prejudicada (Agarwal et al., 2013), os quais estão relacionados ao envelhecimento. Então, a redução da absorção do folato intestinal pode ser devido a gastrite atrófica, redução da ingestão na dieta, consumo de fármacos (particularmente aqueles que causam hipocloridria, uma redução de ácido no estômago) e elevada ingestão de álcool aumentam a susceptibilidade dos indivíduos idosos desenvolverem deficiência de AF quando comparado aos adultos jovens (Araújo et al., 2015).

Evidências tem mostrado uma relação entre a deficiência plasmática de AF e dano cognitivo, indicando deficiência geral e específica nas funções cognitivas como atenção, memória episódica e visuospatial ou raciocínio abstrato em indivíduos com idade igual ou maior de 60 anos (Michelakos et al., 2013). Além disso, Ravaglia et al. (2005) mostrou que deficiência de AF pode ser um fator de risco para o indivíduo idoso em desenvolver a doença de Alzheimer. Alguns estudos também mostram que há uma forte associação entre os níveis de AF e o risco

para desenvolver a depressão em indivíduos idosos, embora a qualidade destes estudos ainda seja limitada. Portanto, a deficiência de AF pode estar associada como o desenvolvimento da depressão (Bottiglieri et al., 2000; Tiemeier et al., 2002; Kim et al., 2008; Beydoun et al., 2010).

A dieta deficiente de AF, pode afetar o fenótipo da prole em modelos animais, bem como, aumentar o risco em desenvolver doenças na vida tardia. A quantidade de doadores de grupamentos metila na dieta materna é especialmente crítica no desenvolvimento embrionário por afetar a metilação de DNA em modelos animais. Neste sentido, AF, o qual ultimamente transfere grupos metila para a metilação do DNA, influencia a metilação do DNA durante o período de desenvolvimento embrionário, que é particularmente vulnerável a disponibilidade reduzida de grupamentos metila. Portanto, durante o envelhecimento, a metilação do DNA genômico e de genes específicos pode ser alterada de maneira tecido-específica. Os níveis de AF podem modificar a metilação do DNA em idosos. Portanto, o envelhecimento e a deficiência de AF podem sinergisticamente promover uma alteração epigenética nas células podendo susceptibilizá-las ao desenvolvimento de doenças (McKay et al., 2004; Kim et al., 2009). Portanto, especula-se se o AF durante a gestação pode interferir na cognição de indivíduos na idade adulta ou idosa (Shea e Rogers, 2014).

1.7 JUSTIFICATIVA

Este estudo justifica-se em função da relevância da nutrição adequada das gestantes, através de dieta apropriada, a fim de prover melhor desenvolvimento da prole, protegendo-a de problemas degenerativos, inibindo-os ou postergando sua manifestação, permitindo aumento na qualidade de vida dos indivíduos, com ênfase naqueles que já apresentam mais de 65 anos de idade (Eussen et al., 2006; Uehara et al., 2010; Walker et al., 2012; Almeida et al., 2012).

Não obstante às particularidades de cada gestante, entende-se que a dieta a elas dirigida deve conter o AF, que apresenta-se como componente nutricional de grande relevância, essencial para o desenvolvimento dos fetos, para o crescimento do indivíduo e o envelhecimento saudável. O estilo de vida da população mundial atual reflete diretamente sobre a dieta das gestantes, que tende a ser inadequada e deficiente, traduzindo-se como uma das principais causas

dos problemas de saúde da geração adulta e idosa (Van Ort et al., 2003; Andrès et al., 2004).

Diante das dietas maternas oferecidas durante a gestação, este trabalho procura avaliar se o efeito da dieta com deficiência ou suplementação de AF interfere em parâmetros cognitivos e inflamatórios na prole fêmea adulta e idosa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros de memória e inflamação na prole adulta e idosa de ratas *Wistar* com deficiência ou suplementação de AF na gestação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a memória de habituação através do teste memória de habituação ao campo aberto na prole adulta e idosa de ratas *Wistar* com deficiência ou suplementação de AF.

Avaliar níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-4) no córtex frontal e hipocampo na prole adulta e idosa de ratas *Wistar* com deficiência ou suplementação de AF.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense a partir do protocolo 100-2014-01 (Anexo A) e os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com diretrizes do CONCEA.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

No presente estudo foram utilizados 80 animais. Uma prole de ratos *Wistar* fêmeas jovens adultas (2 meses) e idosas (18 meses) obtidas da colônia de reprodução do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram aclimatados às condições de laboratório à temperatura ambiente antes do experimento e mantidos sob condições padrão de um ciclo luz/escuro de 12 h de luz com comida e água *ad libitum*, em caixas de plástico com acomodação macia. Todos os procedimentos foram realizados das 07h00min às 17h00min.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

3.3.1 Ratas *Wistar* durante a fase de gestação e lactação

O estudo utilizou um total de 50 ratas *Wistar* adultas virgens que foram mantidas cada uma com um rato *Wistar* macho adulto para acasalamento durante sete dias. A partir do primeiro dia de contato com o macho, as ratas foram separadas aleatoriamente em cinco grupos experimentais maternos (n= 10), onde receberam dois tipos de dieta (ração) especial: dieta *American Institute of Nutrition-93* (AIN 93 - também denominada dieta controle) e dieta deficiente em AF. As

fêmeas que receberam a dieta AIN 93 ainda foram subdivididas em três grupos para que, além desta ração, recebessem a suplementação com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg, totalizando assim, os cinco grupos experimentais maternos (Tabela 1).

Após o acasalamento, todas as ratas permaneceram isoladas e continuaram recebendo a dieta previamente determinada durante todo período gestacional (21 a 28 dias) e lactacional (21 dias). Utilizou-se um número significativo de fêmeas devido ao fato de que o estresse gerado pela oferta de uma nova dieta durante a gestação e lactação, associado à manipulação dos animais, e ao próprio período gestacional, pode provocar aborto ou canibalismo por parte das mães logo após o nascimento dos filhotes (Desantis e Schmaltz, 1984). As ratas que não ficaram prenhas foram desconsideradas deste estudo após 21 a 28 dias de acompanhamento.

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais maternos: fêmeas durante a fase de gestação e lactação.

GRUPOS
1. Dieta AIN 93 ou controle
2. Dieta deficiente em ácido fólico (AF)
3. Dieta AIN 93+suplementação de ácido fólico 5mg/kg (AF 5mg/kg)
4. Dieta AIN 93+suplementação de ácido fólico 10mg/kg (AF 10mg/kg)
5. Dieta AIN 93+suplementação de ácido fólico 50mg/kg (AF 50mg/kg)

Fonte: Dados da pesquisadora, 2016.

3.3.2 Composição das rações (dietas) especiais oferecidas às ratas *Wistar*

Neste estudo, utilizou-se dois tipos de ração (dieta) especial: dieta AIN 93 ou controle e a dieta deficiente em AF. Estas rações foram

confeccionadas e fornecidas pela empresa Pragsoluções Biociências. Estas rações foram oferecidas às ratas dos grupos experimentais maternos, durante todo período de gestação e lactação.

Conforme orientações do fabricante, a ração AIN 93 foi escolhida como dieta controle, pelo fato de ser preparada apenas com ingredientes purificados, onde o amido é amido puro, a sacarose é sacarose e o óleo é somente óleo de soja. Desse modo, foi possível saber exatamente quais foram os componentes de cada fração de macronutrientes (carboidratos, lipídios e as proteínas), além das vitaminas e minerais. Já a ração deficiente em AF foi preparada a partir da ração AIN 93, contendo os mesmos ingredientes purificados, porém o mix de vitaminas é isento de AF. As tabelas de composição nutricional das dietas encontra-se em anexo: AIN 93 (Anexo B), deficiente em AF (Anexo C) e dieta comum (padrão) do Biotério (Anexo D).

Também é importante salientar que não se optou pela ração comum do Biotério como dieta controle neste experimento, por três motivos. Primeiramente, o fato da dieta deficiente em AF ser elaborada somente a partir da dieta AIN 93 que contém ingredientes purificados. Em segundo lugar, o fato da ração comum não ser purificada, apresentando um padrão nutricional diferente, inclusive em relação à fonte proteica que é de origem vegetal quando comparada a proteína da ração AIN 93 (origem animal). Adicionalmente, a ração comum é preparada com ingredientes integrais como o milho em grão que contém frações de amido, óleo de milho, além de proteína, vitaminas e minerais misturados no mesmo grão e, assim, ocorre com os demais ingredientes da ração. Desta forma, torna-se difícil elaborar uma dieta livre de AF a partir da ração comum, visto que esta vitamina além de adicionada na ração pode estar presente nos demais ingredientes utilizados (grãos integrais) em maior ou menor concentração, dificultando ainda mais a eliminação total do AF para obter-se a ração deficiente nesta vitamina.

3.3.3 Suplementação de AF para as ratas *Wistar* durante a fase de gestação e lactação

As ratas *Wistar* que receberam a dieta AIN 93 foram divididas em cinco grupos, conforme já demonstrado na Tabela 1, para suplementação com AF. O AF suplementado nas doses de 5, 10 e 50

mg/kg foi solubilizado em água em um volume de 1ml/100g e administrado por via oral (v.o.) uma vez ao dia, durante toda a fase de gestação e lactação. A dose de suplementação foi administrada conforme respectivo peso de cada rata, de acordo com Brocardo et al (2010) e Budni et al (2013).

3.3.4 Controle de Peso Gestacional e consumo de ração das Ratas *Wistars*

O peso da ração (dieta) oferecida às ratas foi monitorado duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras) durante todo período de administração da dieta. A partir do primeiro dia de contato com o macho, o casal inicialmente recebeu 300g de ração conforme a dieta determinada: AIN 93 ou deficiente.

Durante o acasalamento, foi calculada a média do consumo de ração, visto que os animais estiveram em dois na mesma caixa e consumiram a mesma dieta. Após o acasalamento, as ratas permaneceram isoladas recebendo a quantidade suficiente para completar os 300g de ração especial, duas vezes por semana.

O peso das fêmeas também foi monitorado semanalmente (sextas-feiras) durante todo período gestacional. Utilizou-se uma balança (marca Balmak) disponível no Biotério, sendo que um béquer de plástico foi colocado sobre a balança e a mesma foi tarada, para posterior pesagem das fêmeas individualmente no béquer. O controle de peso durante estas fases foi importante para o acompanhamento de ganho ou perda de peso conforme a dieta oferecida às fêmeas mães.

Ainda foi realizada a contagem do número total de filhotes ao nascer de cada gestante conforme sua dieta previamente determinada. Salientamos que após o nascimento da prole, todos os filhotes (machos e fêmeas) permaneceram junto à mãe para a amamentação por 21 dias e as mães continuaram recebendo a mesma dieta oferecida na gestação até o final da lactação. Logo após o desmame, a prole foi submetida à sexagem e o número de filhotes machos e fêmeas também foi levado em consideração, de acordo com a dieta materna. Os filhotes machos serão utilizados em outros experimentos.

3.3.5 Prole Fêmea Jovem Adulta de ratas *Wistar*

Imediatamente após o nascimento da prole, o peso dos filhotes fêmeas foi coletado por meio de uma balança (marca Balmak) situada no Biotério. Posteriormente, o peso da prole fêmea continuou sendo acompanhado aos 21, 30 e 60 dias de vida dos animais.

A prole fêmea, ao chegar à fase adulta, foi dividida em grupos conforme a dieta materna, totalizados 5 grupos experimentais, ou seja: dieta AIN 93, dieta deficiente de AF, dieta AIN 93 + AF 5 mg/kg, dieta AIN 93 + AF 10 mg/kg e dieta AIN 93 + AF 50 mg/kg. Cada grupo experimental contou com 10 animais, sendo 5 grupos experimentais, totalizando 50 animais para o grupo da prole de ratas *Wistar* jovens adultas. Ressalta-se que logo após o desmame foi introduzida ração padrão do Biotério (CPB) e água *ad libidum* para estes animais até completarem 2 meses. Salienta-se que a prole de machos adultos das ratas *Wistar* foi destinada a outro grupo de pesquisa do mesmo Laboratório.



Figura 1: Desenho experimental da prole adulta jovem.

Fonte: Dados da pesquisadora, 2016.

As ratas *Wistar* foram separadas aleatoriamente em cinco grupos experimentais maternos (n= 10), onde receberam dois tipos de dieta (ração) especial - dieta AIN 93 (dieta controle) e dieta deficiente em ácido fólico - durante todo período gestacional (21 a 28 dias) e lactacional (21 dias). As fêmeas que receberão a dieta AIN 93 ainda foram subdivididas em três grupos para que, além desta ração, recebessem a suplementação com AF nas doses de 5, 10 e 50 mg/kg (v.o.), totalizando assim, os cinco grupos experimentais maternos. O peso gestacional, o consumo de ração das ratas, bem como o número de filhotes foi considerado. Após a fase de amamentação, a prole continuou dividida conforme a dieta das mães, porém receberam a dieta padrão do biotério. Assim que completaram 2 meses foi realizado o teste comportamental (teste de memória de habituação ao campo aberto), logo após foram submetidas a eutanásia, dissecadas e retiradas as seguintes estruturas: córtex frontal e hipocampo. Posteriormente, foram realizadas as análises bioquímicas para avaliar os níveis de citocinas: TNF- α , IL1 β e IL-4.

3.3.6 Prole Fêmea Idosa de ratas *Wistar*

Imediatamente após o nascimento da prole, o peso dos filhotes fêmeas foi coletado por meio de uma balança (marca Balmak) situada no Biotério. Posteriormente, o peso da prole fêmea continuou sendo acompanhado aos 21, 30, 60 e 540 dias de vida dos animais.

A prole fêmea, ao chegar à fase idosa, foi dividida em grupos conforme a dieta materna, totalizados 3 grupos experimentais, ou seja: dieta AIN 93, dieta deficiente de AF, dieta AIN 93 + AF 10 mg/kg. Cada grupo experimental contou com 10 animais, sendo 3 grupos experimentais, totalizando 30 animais para o grupo da prole de ratas *Wistar* idosas. Ressalta-se que logo após o desmame foi introduzida ração padrão do Biotério (CPB) e água *ad libidum* para estes animais até completarem 18 meses.

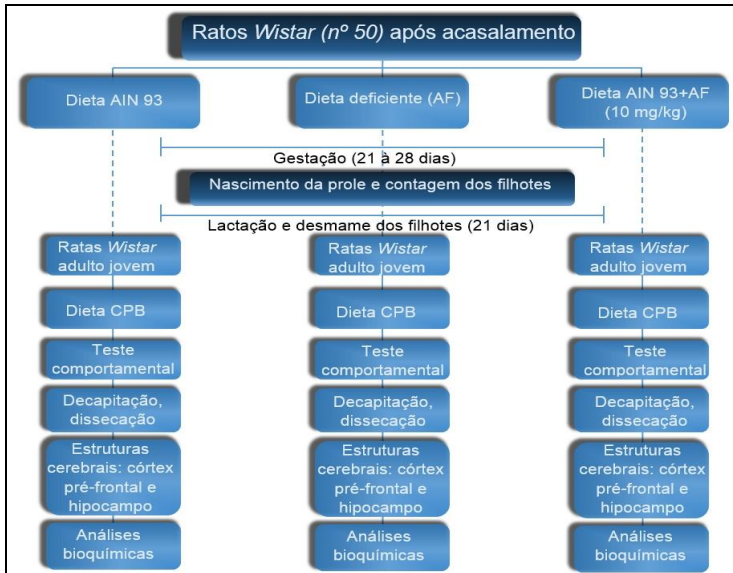


Figura 2: Desenho experimental prole idosa.

Fonte: Dados da pesquisadora, 2016.

Para o envelhecimento dos animais foi escolhida apenas a dose de 10 mg/kg do AF, pois a curva foi realizada com o intuito de escolher a dose com melhor efeito no comportamento e na bioquímica das ratas jovens. E a dose escolhida, baseada nos resultados, foi a dose de 10 mg/kg.

Assim que completaram 18 meses foi realizado o teste comportamental (teste de memória de habituação ao campo aberto), logo após foram submetidas a eutanásia, dissecadas e retiradas as seguintes estruturas: córtex frontal e hipocampo. Posteriormente foram realizadas as análises bioquímicas para avaliar os níveis de citocinas: TNF- α , IL1 β e IL-4.

3.4 TESTE MEMÓRIA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

O teste foi realizado em um campo aberto, caixa com o fundo de madeira compensada marrom de 45 cm \times 60 centímetros, delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 paredes de madeira e parede frontal de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os

animais foram colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual exploraram livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repetiu o procedimento do treino. Os números de cruzamentos horizontais (*crossing*) e levantamentos verticais (*rearing*) executadas por cada rata durante um período de observação de 5 minutos foram contados por um observador experiente (Vianna et al., 2000).

3.5 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após a avaliação comportamental de memória de habituação, os animais foram imediatamente eutanasiados por decapitação na guilhotina e as estruturas cerebrais hipocampo e o córtex frontal foram dissecados para realização das análises de níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-4). Após a dissecação, as estruturas cerebrais foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento das análises bioquímicas.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Avaliação dos níveis de citocinas

O córtex frontal e o hipocampo foram homogeneizados em solução de extração contendo aprotinina (100 mg de tecido por 1 mL). A concentração de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-4) foi determinada nestas estruturas cerebrais utilizando-se kits ELISA disponíveis comercialmente, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (kits DuoSet, R & amp; D Systems; Minneapolis). Os resultados foram apresentados em pg/100 mg de tecido.

3.7 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via ou teste t de Student, conforme o protocolo experimental, seguida do teste post hoc de Newman Kewlls, quando apropriado. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 MEMÓRIA DE HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO

A figura 3 A mostra os resultados do teste de habituação ao campo aberto quanto ao número de cruzamentos. Foi observado que os animais com dois meses dos grupos controle, deficiente, AF 5 e AF 10 mg/kg reconheceram o ambiente novo após a segunda exposição, ou seja, não apresentaram dano na memória de habituação. Porém, os animais do grupo AF 50 mg/kg apresentaram dano na memória de habituação. Entretanto, os animais com 18 meses dos grupos controle e deficiente não reconheceram o ambiente novo após a segunda exposição, apresentando dano na memória de habituação. Já o grupo AF 10 mg/kg reconheceu o ambiente novo após a segunda exposição, evidenciando que ocorreu o aprendizado, logo o AF 10 mg/kg foi protetor na memória de habituação com animais de 18 meses.

A figura 3 B mostra o resultado do teste de habituação ao campo aberto quanto ao número de levantamentos. Foi observado que os animais com dois meses dos grupos controle, deficiente, AF 5, AF 10 e AF 50 mg/kg reconheceram o ambiente novo após a segunda exposição, ou seja, não apresentaram dano na memória de habituação, ressaltando que o grupo AF 50 mg/kg também apresentou aprendizado, divergindo do resultado dos cruzamentos, logo esse achado pode sugerir que o dano foi parcial. Entretanto, os animais com 18 meses dos grupos controle e deficiente apresentaram dano na memória de habituação. Estes resultados foram semelhantes aos resultados apresentados quanto aos cruzamentos, mas o grupo AF 10 mg/kg reconheceu o ambiente novo após a segunda exposição, evidenciando que ocorreu o aprendizado, logo o tratamento com AF 10 mg foi capaz de reverter o dano causado pela envelhecimento em animais com 18 meses.

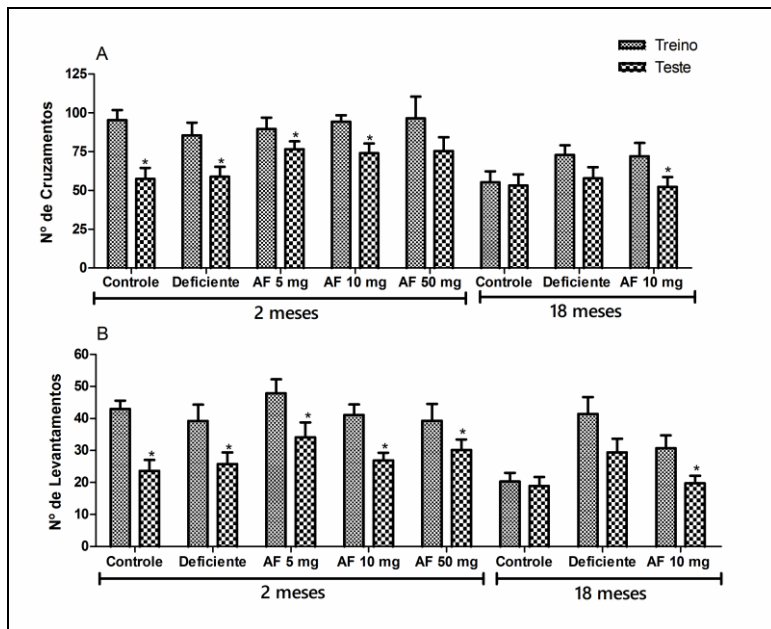


Figura 3: Efeito na prole adulta e idosa da deficiência ou suplementação de ácido fólico (AF) de mães durante a gestação na memória de habituação. Foi observado o número de cruzamentos (3A) e o número de levantamentos (3B) no teste de memória de habituação ao campo aberto realizados em ratos Wistar. Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média, $n = 8-10$. * $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo na sessão treino. Fonte: Dados da pesquisadora, 2016.

4.2 NÍVEIS DE TNF- α

A figura 4 A mostra os resultados dos níveis de citocinas TNF- α no córtex frontal. Não houve nenhuma diferença significativa no córtex frontal nos níveis de citocinas TNF- α , tanto nos animais de 2 meses, como também nos de 18 meses.

A figura 4 B mostra os resultados dos níveis de citocinas TNF- α no hipocampo. Nos animais com dois meses, em todos os grupos (controle, deficiente, AF 5 mg/kg, AF 10 mg/kg e AF 50 mg/kg) não houve diferença significativa. Entretanto, nos animais com 18 meses, o grupo controle aumentou os níveis de TNF- α quando comparado ao controle 2 meses. Já o grupo deficiente 18 meses aumentou também, embora

menos que o grupo controle 18 meses, enquanto que, o grupo AF 10 mg/kg reduziu significativamente os níveis de TNF- α aos níveis do grupo controle 18 meses.

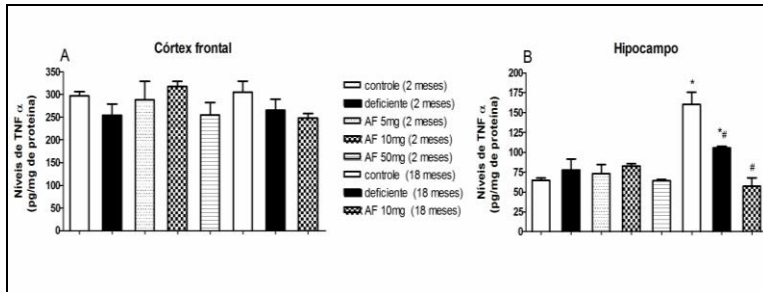


Figura 4: Efeito na prole adulta e idosa da deficiência ou suplementação de ácido fólico (AF) de mães durante a gestação nos níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Foi observado os níveis do TNF- α no córtex frontal (4A) e no hipocampo (4B) realizados em ratos Wistar. Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média, $n = 4-5$. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle 2 meses. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle 18 meses.

Fonte: Dados da pesquisadora, 2016.

4.3 NÍVEIS DE IL-1 β

A figura 5 A mostra os resultados dos níveis de citocinas IL-1 β no córtex frontal. Foi observado que os níveis de IL-1 β não foram alterados no córtex frontal nos animais de 2 e 18 meses em nenhum dos grupos (controle, deficiente, AF 5 mg/kg, AF 10 mg/kg e AF 50 mg/kg) estudados. Logo, no córtex frontal, não houve diferenças significativas entre os grupos.

A figura 5 B mostra os resultados dos níveis de citocinas IL-1 β no hipocampo. Foi observado que houve uma redução dos níveis de IL-1 β no grupo AF 50 mg/kg nos animais de dois meses. Já os animais com 18 meses, no grupo controle, houve um aumento nos níveis de IL-1 β quando comparado ao controle 2 meses. E no grupo deficiente teve também um aumento importante nos níveis de IL-1 β ainda maiores que o do controle de 18 meses. Entretanto, o grupo AF 10 mg/kg reverteu este efeito, reduzindo os níveis de IL-1 β , voltando ao nível do grupo

controle. Assim, evidenciando a proteção do AF 10 mg/kg em ratos idosos.

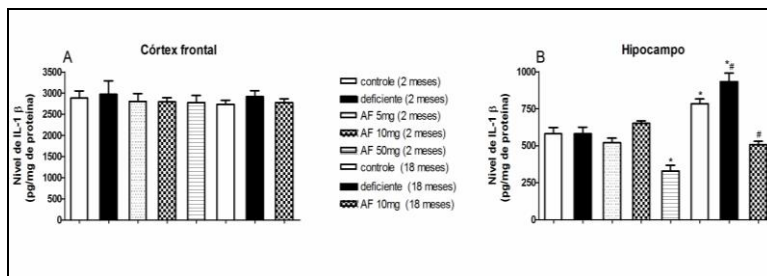


Figura 5: Efeito na prole adulta e idosa da deficiência ou suplementação de ácido fólico (AF) de mães durante a gestação nos níveis de interleucina 1 β (IL-1 β). Foi observado os níveis de IL-1 β no córtex frotal (5A) e no hipocampo (5B) realizados em ratos Wistar. Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média, n= 4-5. * p < 0,05 quando comparado com o grupo controle 2 meses. # p < 0,05 quando comparado com o grupo controle 18 meses.

Fonte: Dados da pesquisadora, 2016.

4.4 NÍVEIS DE IL-4

A figura 6 A mostra os resultados dos níveis de citocinas IL-4 no córtex frontal. Foi observado que nos animais com dois meses, os níveis de IL-4 foram aumentadas no grupo AF 10 mg/kg, sendo que, no grupo AF 50 mg/kg reduziu os níveis de IL-4. Por outro lado, os animais com 18 meses, os níveis de IL-4 reduziram no grupo controle quando comparado ao controle 2 meses, e o AF 10 mg/kg aumentou significativamente os níveis de IL-4, sendo superior ao controle. Mais uma vez, o AF 10 mg/kg mostra-se protetor para os ratos idosos.

A figura 6 B mostra os resultados dos níveis de citocinas IL-4 no hipocampo. Foi observado que, nos animais com dois meses, os grupos deficiente e AF 50 mg/kg reduziram os níveis IL-4 quando comparados ao controle 2 meses e o grupo AF 10 mg/kg aumentou os níveis de IL-4 quando comparado ao controle jovem. Entretanto, os animais com 18 meses, não houve nenhuma significância.

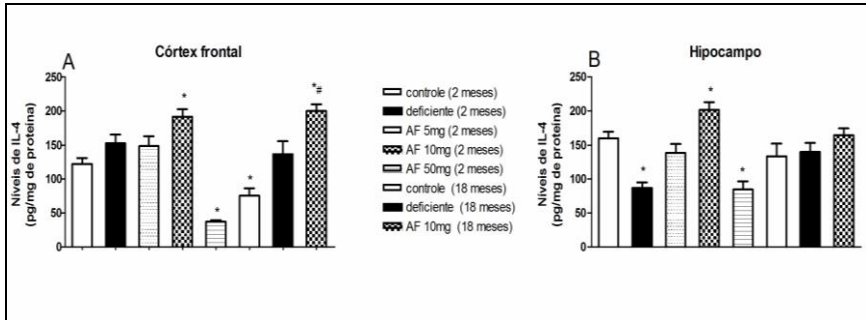


Figura 6: Efeito na prole adulta e idosa da deficiência ou suplementação de ácido fólico (AF) de mães durante a gestação nos níveis de interleucina 4 (IL-4). Foi observado os níveis de IL-4 no córtex frotal (6A) e no hipocampo (6B) realizados em ratos Wistar. Os dados estão representados como a média \pm erro padrão da média, $n= 4-5$. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle 2 meses. # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle 18 meses.

Fonte: Dados da pesquisadora, 2016.

5 DISCUSSÃO

Muitas evidências indicam que há uma forte relação entre a deficiência de AF e transtornos psiquiátricos e doenças neurodegenerativas (Kronenberg et al., 2008; Kronenberg et al., 2009; Berrocal-Zaragoza et al., 2014; Tomizawa et al., 2015). O presente estudo mostra que a deficiência de AF no período gestacional, não altera a memória de habituação na prole adulta e nem mesmo na prole idosa, porém a prole de ratas suplementadas com AF 10 mg/kg apresenta proteção contra o declínio cognitivo observado no envelhecimento.

O prejuízo cognitivo é um aspecto universal no processo de envelhecimento (West 2004). Estudos prévios sugerem que o aprendizado e a memória declinam gradualmente com o decorrer da idade em humanos (Albert, 1993) e ratos (Wyss et al., 2000). Esta alteração cognitiva pode limitar a independência e indicar sinais de demência em humanos (Salthouse, 2012). Evidências indicam que o declínio cognitivo em humanos pode ser detectável precocemente na idade adulta. Estas alterações podem ser observadas mais precocemente em indivíduos com 45 anos ou menos (Salthouse, 2009; Singh-Manoux et al., 2012). O declínio cognitivo associado com a idade em roedores, especificamente em ratos, pode ser observado a partir dos 10 meses de idade e então é usado como modelo animal de envelhecimento para o estudo da neurobiologia do mesmo. Ratos a partir de 10 meses de idade podem ser considerado como ratos de meia idade (Vila-Luna et al., 2012; Galisova et al., 2014; Neese et al., 2014; Smiljanic et al., 2015) e já apresentam dano cognitivo natural do envelhecimento (Vila-Luna et al., 2012; Galisova et al., 2014; Neese et al., 2014). Animais com idade de 16 meses pode ser considerados em meia idade ou idosos (Choi et al., 2010; Weinstock et al., 2011). Geralmente, ratos acima de 18 meses, o declínio cognitivo vai sendo mais acentuado com a progressão da idade e estes animais podem ser considerados mais concretamente idosos (Popa-Wagner et al., 2010; Singh et al., 2011; Létondor et al., 2016). Os resultados do presente estudo estão de acordo estes dados da literatura, mostrando dano na memória de habituação aos 18 meses de idade. Este dano na memória de habituação pode ser atribuído ao avançar da idade e o mesmo resultado foi observado em animais, cuja as mães apresentaram deficiência de AF. Este efeito não foi observado em

animais jovens com 2 meses e nem mesmo animais jovens, cujas mães apresentaram deficiência de AF. Portanto, reforça o fato de que o prejuízo na memória de habituação está relacionada ao envelhecimento.

Os animais com 18 meses, cujas mães não estiveram com deficiência de AF na gestação, mas foram suplementadas com 10 mg/kg desta vitamina apresentaram proteção contra o dano na memória de habituação causado pelo envelhecimento. Um estudo conduzido por Joshi et al. (2004) mostrou que a prole com 6 meses de idade de ratas com dieta deficiente de AF mostrou prejuízo na memória espacial somente no primeiro dia de teste, mas não no segundo, terceiro e quarto dias no labirinto aquático. A suplementação de AF 2 mg/kg na gestação não causou nenhum dano neste teste comportamental (Joshi et al., 2004). Em um estudo clínico com crianças indianas, foi observado que o AF nas concentrações consideradas dentro dos valores de referência normais pode estar fortemente relacionado a função cognitiva das crianças, mas não somente ao fechamento do tubo neural. Então, o AF pode ser importante também para o crescimento inicial do cérebro e o desempenho cognitivo. Outro estudo em humanos mostrou que crianças com 6-8 anos de idade de mães com baixas concentrações de AF durante a gestação, mostraram escores baixos nos teste que avaliaram os subdomínios cognitivos como linguagem, aprendizado/memória visuo-espacial (Ars et al., 2016). Portanto, os resultados do presente estudo corroboram com a literatura, indicando um papel essencial desta vitamina na cognição. Vale ressaltar que não foi observado este efeito do AF na prole infantil, mas na prole adulta e idosa. É possível que o efeito na prole da deficiência de AF da mãe foi refletida somente nos idosos, porém como já apresentaram *per se* redução na memória de habituação, não apareceu o efeito da deficiência, mas a suplementação protegeu contra o declínio da memória induzida pelo envelhecimento.

A suplementação com AF durante a gravidez é uma das intervenções nutricionais mais comuns em países em desenvolvimento (Scholl e Johnson, 2000; Fekete et al., 2010). Há estudos mostrando a importância da suplementação de AF (Parker et al., 2013; Barua et al., 2014). Contudo, isso ainda não está totalmente elucidado, pois o AF materno pode induzir potenciais efeitos epigenéticos sobre o genoma da descendência que pode variar com a habilidade metabólica, da raça, sexo, localização geográfica ou interações com outros nutrientes. Isso pode explicar as inconsistências entre os estudos (Barua et al., 2014).

O presente trabalho também aponta evidências de que a prole jovem de ratas suplementadas com AF 50 mg/kg durante a gestação mostra dano na memória de habituação. O excesso de AF tem sido uma preocupação atualmente (Selhub e Rosenberg, 2016), pois um estudo conduzido por Keating et al. (2015) mostrou que o excesso de AF (40 mg/kg) durante a gestação e lactação predispôs a prole adulta à resistência a insulina. Outros estudos mostram que o excesso de AF pode estar associado atividade baixa das células *natural killer* em mulheres idosas (Troen et al., 2006) e camundongos idosos (Sawaengsri et al., 2016). Também foi observado que altas doses de AF pode causar alteração da morfologia celular como encontrada em um rato com dieta deficiente de AF (Partearroyo et al., 2016). Um estudo conduzido por Barua et al. (2016) mostram que altas doses de AF pode implicar em susceptibilidade aumentada para o desenvolvimento de autismo na prole de camundongos. Em idosos, o excesso de AF pode estar relacionado com declínio cognitivo (Morris et al., 2007).

Estudos clínicos e pré-clínicos sobre as consequências nos filhos ou prole de mães suplementadas com AF durante a gestação pode contribuir à comunidade médica melhorias na saúde publica. Além do mais, é necessário precisamente diferenciar a necessidade desta vitamina na nutrição, fortificação e suplementação (Barua et al., 2014).

Neste estudo foi observado primeiramente que o envelhecimento mostrou declínio cognitivo e a deficiência de AF também, porém a prole idosa, cujas as mães foram administradas com 10 mg/kg de AF na gestação, não apresentaram este declínio na memória de habituação. Estudos mostram que o prejuízo do aprendizado e memória pode envolver a neuroinflamação (Belarbi et al., 2012; Baierle et al., 2015; Stranahan et al., 2016). O envelhecimento é associado com um declínio geral das funções cognitivas. O efeito progressivo do envelhecimento no SNC resulta em prejuízo cognitivo e comportamental (Navarro et al., 2002; Pieramico et al., 2014). Tem sido demonstrado que o envelhecimento está associado com a neuroinflamação, sendo esta o maior fator de risco para o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. Além disso, é evidente a correlação entre a neuroinflamação e a redução da performance comportamental no envelhecimento natural (Barrientos et al., 2009; Baierle et al., 2015).

Portanto, o presente estudo com o intuito de investigar o papel da neuroinflamação no efeito na prole jovem e idosa, de mães com

deficiência ou suplementação de AF durante a gestação, avaliou-se os níveis de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-4 no córtex frontal e hipocampo destes animais. Acompanhando os resultados da memória de habituação ao campo aberto, foi observado que os níveis de TNF- α e IL-1 β foram aumentados no hipocampo da prole idosa de mães controle e com deficiência de AF. A prole idosa de mães suplementadas com AF 10 mg/kg obteve proteção contra este aumento. O envelhecimento natural é associado com liberação elevada de citocinas pró-inflamatórias e ativação glial. A microglia do cérebro envelhecido torna-se super reativa e produz um aumento exacerbado de TNF- α (Kalehua et al., 2000; Choi et al., 2010). Ocorre o envelhecimento do sistema imune, também chamado de imunosenescência acompanhada de um ambiente pró-inflamatório de baixo grau em muitos tecidos caracterizados pela produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , proteína C reativa, EROs e autoanticorpos. Este ambiente também chamado de *inflammaging* é o resultado da senescência celular (Franceschi et al., 2000; Vasto et al., 2007; Wagner et al., 2016). A IL-1 β pode suprimir a LTP (potenciação de longa duração) no hipocampo (Lynch e Lynch, 2002), uma forma de plasticidade sináptica (Mendelsohn e Larrick, 2012) que está reduzida no envelhecimento (Griffin et al., 2006; Mendelsohn e Larrick, 2012) e que está associada ao prejuízo cognitivo (Morgan et al., 1999; Mendelsohn e Larrick, 2012). Realmente, no presente estudo foi observado que os níveis de TNF- α e IL-1 β estavam aumentados no hipocampo, mas não no córtex frontal de animais com 18 meses de idade. O aumento destas citocinas podem explicar o dano na memória de habituação destes animais.

Além disso, a suplementação da mãe durante a gestação protegeu a prole contra o aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β no envelhecimento. Um estudo conduzido por Zhao et al. (2013) mostrou que a suplementação de AF na gestação protegeu a prole contra o parto pré-termo e morte precoce de camundongos. Zhao et al. (2014) também mostrou que a administração de AF 3 mg/kg preveniu a abertura do tubo neural via redução da fosforilação da JNK e atenuou a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 na placenta, soro materno e fluido amniótico. Além disso, Chen et al. (2016) avaliaram o efeito anti-inflamatório da suplementação de AF durante 6 meses em paciente com a doença de Alzheimer. Este estudo mostrou que o RNAm para TNF- α estava reduzido no plasma de pacientes com a doença de Alzheimer e que administravam AF. Portanto, os resultados do presente estudo estão de

acordo com dados da literatura, apesar de que poucos estudos mostram a relação entre a sua deficiência e/ou suplementação e a neuroinflamação.

Neste estudo também foi analisado os níveis de IL-4 na prole jovem e idosa. No córtex frontal, foi observado que nos animais jovens de mães com suplementação com AF 10 mg/kg houve aumento desta interleucina e na prole de mães com suplementação com AF 50 mg/kg houve redução da IL-4, o que pode explicar o dano na memória de habituação deste animais. No córtex frontal de animais idosos foi observado redução da IL-4 no grupo controle e o grupo AF 10 mg/kg foi observado aumento desta interleucina. Já no hipocampo, foi observadas mudanças dos níveis da IL-4 somente em ratas jovens. Os níveis de IL-4 foram reduzidos nos grupos deficiente e AF 50 mg/kg e os níveis foram encontrados aumentados no grupo AF 10 mg/kg. A IL-4 é uma citocina, cuja o papel ainda não está bem estabelecido, mas sabe-se que pode alternativamente ativar a microglia a qual está envolvida no crescimento de neuritos e processos de reparo depois de um dano no SNC. Porém este processo podem estar comprometido no envelhecimento (Fenn et al., 2014). Isso explica, pelo menos em parte, pouca ou nenhuma alteração desta citocina em animais velhos. Porém, um estudo conduzido por Field et al. (2006) mostrou que a suplementação de ratos com 11 e 24 meses mostraram aumento nos níveis de IL-4, tendo um papel importante no envelhecimento. Há ainda alguma contradições sobre a IL-4, portanto, mais estudos devem ser realizados para elucidar esta citocina e sua relação com o envelhecimento.

6 CONCLUSÃO

A suplementação de AF durante a gestação pode ter um efeito protetor principalmente no envelhecimento, já que foi capaz de reverter o dano causado pelo mesmo, podendo ser uma possível estratégia terapêutica para o declínio cognitivo associado ao envelhecimento. O mecanismo que envolve o efeito do AF é explicado, pelo menos em parte, pela redução processo neuroinflamatório, ou seja, redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β e aumento de IL-4 em tecido cerebral.

Neste trabalho foi observado também que o excesso de AF durante a gestação, pode induzir a um déficit cognitivo na idade adulta. O mecanismo do excesso de AF pode envolver, pelo menos em parte, a redução da IL-4 no córtex frontal e hipocampo.

REFERÊNCIAS

Acuña, K; Cruz, T. Avaliação do Estado Nutricional de Adultos e Idosos e Situação Nutricional da População Brasileira. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48(3): 345-61.

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000;406(6797):782-7.

Agarwal E, Miller M, Yaxley A, Isenring E. Malnutrition in the elderly: a narrative review. *Maturitas.* 2013; 76(4):296-302.

Albert M. Neuropsychological and neurophysiological changes in healthy adult humans across the age range. *Neurobiol Aging.* 1993;14:623–25.

Allen LH. How common is vitamin B-12 deficiency? *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(2):693S-6S.

Almeida L, Quintão S. Depression and suicidal ideation in elderly institutionalized and non-institutionalized in Portugal. *Acta Med Port.* 2012; 25(6):350-8.

Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Noblet-Dick M, Maloisel F, Schlienger JL, Blicklé JF. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ.* 2004;171(3):251-9.

Araújo JR, Martel F, Borges N, Araújo JM, Keating E. Folates and aging: Role in mild cognitive impairment, dementia and depression. *Ageing Res Rev.* 2015; 22:9-19.

Ars CL, Nijs IM, Marroun HE, Muetzel R, Schmidt M, Steenweg-de Graaff J, van der Lugt A, Jaddoe VW, Hofman A, Steegers EA, Verhulst FC, Tiemeier H, White T. Prenatal folate, homocysteine and vitamin B12 levels and child brain volumes, cognitive development and psychological functioning: the Generation R Study. *Br J Nutr.* 2016; 22:1-9.

Avila R, Borrino CMC. Avaliação neuropsicológica das demências. In: Fluentes D, Diniz LFM, Camargo CHP, Consenza RM e cols. Neuropsicologia – teoria e prática. POA: Artmed, p 187-206, 2008.

Avitsur R, Yirmiya R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999;64(4):787-96.

Baierle M, Nascimento SN, Moro AM, Brucker N, Freitas F, Gauer B, Durgante J, Bordignon S, Zibetti M, Trentini CM, Duarte MM, Grune T, Breusing N, Garcia SC. Relationship between inflammation and oxidative stress and cognitive decline in the institutionalized elderly. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015:804198.

Barichello T, Generoso JS, Simões LR, Steckert AV, Moreira AP, Domingui D, Ferrari P, Gubert C, Kapczinski F, Jornada LK, Danielski LG, Petronilho F, Budni J, Quevedo J. Folic acid prevented cognitive impairment in experimental pneumococcal meningitis. *J Neural Transm (Vienna).* 2015; 122(5):643-51.

Barrientos RM, Frank MG, Hein AM, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Time course of hippocampal IL-1 beta and memory consolidation impairments in aging rats following peripheral infection. *Brain Behav Immun.* 2009; 23(1):46-54.

Barua S, Kuizon S, Brown WT, Junaid MA. High Gestational Folic Acid Supplementation Alters Expression of Imprinted and Candidate Autism Susceptibility Genes in a sex-Specific Manner in Mouse Offspring. *J Mol Neurosci.* 2016; 58(2):277-86.

Belarbi K, Arellano C, Ferguson R, Jopson T, Rosi S. Chronic neuroinflammation impacts the recruitment of adult-born neurons into behaviorally relevant hippocampal networks. *Brain Behav Immun.* 2012; 26(1):18-23.

Berrocal-Zaragoza MI, Sequeira JM, Murphy MM, Fernandez-Ballart JD, Abdel Baki SG, Bergold PJ, Quadros EV. Folate deficiency in rat pups during weaning causes learning and memory deficits. *Br J Nutr.* 2014; 112(8):1323-32.

- Beydoun MA, Shroff MR, Beydoun HA, Zonderman AB. Serum folate, vitamin B-12, and homocysteine and their association with depressive symptoms among U.S. adults. *Psychosom Med.* 2010; 72(9):862-73.
- Birren JE, Schaie KW, Abeles RP, Gatz M, Salthouse TA. *Handbook of the Psychology of Aging*. 6th edn, Elsevier Academic Press: Amsterdam, Boston; 2006, p. xxi.
- Bishop NA, Lu T, Yankner AB. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature.* 2010; 464:529–35.
- Borba LO, Guimarães AN, Mazza VA, Maftum MA. Mental health care based on the psychosocial model: reports of relatives and persons with mental disorders. *Rev Esc Enferm USP.* 2012;46:1406-14.
- Bottiglieri T, Laundy M, Crellin R, Toone BK, Carney MW, Reynolds EH. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000; 69(2):228-32.
- Brocardo P de S, Budni J, Lobato KR, Kaster MP, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol.* 2008b; 598(1-3):37-42.
- Brocardo PS, Budni J, Kaster MP, Santos AR, Rodrigues AL. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology.* 2008a; 54(2):464-73.
- Brocardo PS, Budni J, Lobato KR, Santos AR, Rodrigues AL. Evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of folic acid in the mouse forced swimming test. *Behav Brain Res.* 2009; 200(1):122-7.
- Brocardo PS, Budni J, Pavesi E, Franco JL, Uliano-Silva M, Trevisan R, Terenzi MG, Dafre AL, Rodrigues AL. Folic acid administration prevents ouabain-induced hyperlocomotion and alterations in oxidative stress markers in the rat brain. *Bipolar Disord.* 2010; 12(4):414-24.
- Budni J, Freitas AE, Binfaré RW, Rodrigues AL. Role of potassium channels in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced

swimming test in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012b; 101(1):148-54.

Budni J, Lobato KR, Binfaré RW, Freitas AE, Costa AP, Martín-de-Saavedra MD, Leal RB, Lopez MG, Rodrigues AL. Involvement of PI3K, GSK-3 β and PPAR γ in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *J Psychopharmacol.* 2012a; 26(5):714-23.

Budni J, Zomkowski AD, Engel D, Santos DB, dos Santos AA, Moretti M, Valvassori SS, Ornell F, Quevedo J, Farina M, Rodrigues AL. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol.* 2013; 240:112-21.

Cahn-Weiner DA, Boyle PA, Malloy PF. Tests of executive function predict instrumental activities of daily living in community-dwelling older individuals. *Appl Neuropsychol.* 2002; 9(3):187-91.

Carvalho MVH, Carvalho PN. Inflammation and systemic inflammatory response syndrome. *Revista Brasileira de Medicina.* 2007; 64: 397-399.

Chen H, Liu S, Ji L, Wu T, Ji Y, Zhou Y, Zheng M, Zhang M, Xu W, Huang G. Folic Acid Supplementation Mitigates Alzheimer's Disease by Reducing Inflammation: A Randomized Controlled Trial. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016:5912146.

Choi DY, Zhang J, Bing G. Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. *Neurobiol Aging.* 2010; 31(9):1649-53.

Choi DY, Zhang J, Bing G. Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. *Neurobiol Aging.* 2010; 31(9):1649-53.

Correa, ACO. Neuropsicologia da memória e sua avaliação. In: Fluentes D, Malloy-Diniz LF, Camargo CHP, Cosenza RM (Org). *Neuropsicologia – teoria e prática.* Porto Alegre: Artmed; 2008 p 187-206.

Coussirat (2010). Prevalência de deficiência de vitamina B12 e ácido fólico e sua associação com anemia em idosas atendidos em um hospital universitário. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica, 2010.

Cunningham C: Systemic inflammation and delirium: important co-factors in the progression of dementia. *Biochem Soc Trans* 2011, 39:945–953.

da Costa JP, Vitorino R, Silva GM, Vogel C, Duarte AC, Rocha-Santos T. A synopsis on Aging - theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev.* 2016.

Daum I, Graber S, Schugens MM, Mayes AR. Memory dysfunction of the frontal type in normal ageing. *Neuroreport.* 1996; (15-17)7: 2625-28.

de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull.* 2008; 29(2 Suppl):S238-44.

De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, Uh SH, Lowry RB, Sibbald B, Evans JA, Van den Hof MC, Zimmer P, Crowley M, Fernandez B, Lee NS, Niyonsenga T. Reduction in Neural-Tube Defects after Folic Acid Fortification in Canada. *N Engl J Med.* 2007;357(2):135-42.

Desantis DT, Schmaltz LW. The mother-litter relationship in developmental rat studies: cannibalism vs caring. *Dev Psychobiol.* 1984;17(3):255-62.

Dolan RJ, Fletcher PC. Dissociating prefrontal and hippocampal function in episodic memory encoding. *Nature.* 1997 388 (6642): 582-5.

Duthie, SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull.* 1999;55(3):578-92.

Eussen SJ, de Groot LC, Joosten LW, Bloo RJ, Clarke R, Ueland PM, Schneede J, Blom HJ, Hoefnagels WH, van Staveren WA. Effect of oral vitamin B-12 with or without folic acid on cognitive function in older

people with mild vitamin B-12 deficiency: a randomized, placebo-controlled Trial. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(2):361-70.

Fagundes SD, Silva MT, Thees MFRS, Pereira MG. Prevalence of dementia among elderly Brazilians: a systematic review. *Sao Paulo Med J.* 2011; 129(1):46-50.

Fechine BRA, Trompieri N. O processo de envelhecimento: as principais alterações que acontecem com o idoso com o passar dos anos. *Rev Cient Intern.* 2012; 20(1): 106-132.

Fekete K, Berti C, Cetin I, Hermoso M, Koletzko BV, Decsi T. Perinatal folate supply: relevance in health outcome parameters. *Matern Child Nutr.* 2010; 6 Suppl 2:23-38.

Fenn AM, Hall JC, Gensel JC, Popovich PG, Godbout JP. IL-4 signaling drives a unique arginase+/IL-1 β + microglia phenotype and recruits macrophages to the inflammatory CNS: consequences of age-related deficits in IL-4R α after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci.* 2014; 34(26):8904-17.

Field CJ, Van Aerde A, Drager KL, Goruk S, Basu T. Dietary folate improves age-related decreases in lymphocyte function. *J Nutr Biochem.* 2006; 17(1):37-44.

Fletcher PC, Shallice T, Dolan RJ. The functional roles of prefrontal cortex in episodic memory. I. Encoding. *Brain.* 1998; 121:1239-48.

Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908:244-54.

Freitas EV. Tratado de geriatria e gerontologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006;1573.

Galisova A, Baciak L, Jozefovicova M, Just Kukurova I, Kebis A, Amrusova K, Dubovicky M, Estera C, Sadlonova I, Kronnerwetter C, Berg A, Krššák M, Kasparova S. Pathophysiological rat model of vascular dementia: magnetic resonance spectroscopy, microimaging and behavioral study. *Brain Res.* 2014; 1568:10-20.

Gazzaley AH, Weiland NG, McEwen BS, Morrison JH. Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. *Neurosci.* 1996; 16(21):6830-8.

Giunta S. Is inflammaging an auto[innate]immunity subclinical syndrome? *Immunity e Agein.* 2006;3(12).

Glisky EL. Changes in cognitive function in human aging. In D.R. Riddle, (Ed.), *Brain aging: Models, methods, mechanisms.* CRC Press. 2007 (pp. 1-15).

Goto M. Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? *BioScience Trends.* 2008;2(6):218-30.

Grady CL, McIntosh AR, Craik FI. Age-related differences in the functional connectivity of the hippocampus during memory encoding. *Hippocampus.* 2003;13(5):572-86.

Griffin R, Nally R, Nolan Y, McCartney Y, Linden J, Lynch MA. The age-related attenuation in long-term potentiation is associated with microglial activation. *J Neurochem.* 2006; 99(4):1263-72.

Hickson, M. Malnutrition and ageing. *Postgrad Med J.* 2006; 82:2–8.

Hof PR, Duan H, Page TL, Einstein M, Wicinski B, He Y, Erwin JM, Morrison JH. Age-related changes in GluR2 and NMDAR1 glutamate receptor subunit protein immunoreactivity in corticocortically projecting neurons in macaque and patas monkeys. *Brain Res.* 2002; 22;928(1-2):175-86.

Hughes CF, Ward M, Hoey L, McNulty H. Vitamin B12 and ageing: current issues and interaction with folate. *Ann Clin Biochem.* 2013; 50(Pt 4):315-29.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sinopse do Senso Demográfico de 2010. Rio de Janeiro, 2011

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística –IBGE. Censo Demográfico, 2000. Rio de Janeiro: IBGE, 2002.

Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA (BR). Cuidados com idosos foram discutidos em seminário. 16 jul. 2010. Disponível em <http://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=1685>. Acesso em: 27 jul. 2010.

Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentration. *N Engl J Med.* 1999;340(19):1449-54.

Jeckel-Neto EA, Cunha GL. Teorias Biológicas do Envelhecimento. In: FREITAS, EV *et al.* (Orgs.). Tratado de geriatria e gerontologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 13-23.

Johnson JD, Whitlatch CJ, Menne HL. Activity and well-being of older adults: does cognitive impairment play a role? *Res Aging.* 2014; 36(2):147-60.

Joshi S, Rao S, Girigosavi S, Daware M, Kale A, Hegde M. Differential effects of fish oil and folic acid supplementation during pregnancy in rats on cognitive performance and serum glucose in their offspring. *Nutrition.* 2004; 20(5):465-72.

Jurgens HA, Johnson RW. Dysregulated neuronal-microglia cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol.* 2012;233(1):40-8.

Kalehua AN, Taub DD, Baskar PV, Hengemihle J, Muñoz J, Trambadia M, Speer DL, De Simoni MG, Ingram DK. Aged mice exhibit greater mortality concomitant to increased brain and plasma TNF-alpha levels following intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide. *Gerontology.* 2000; 46(3):115-28.

Kallus KW, Schmitt JA, Benton D. Attention, psychomotor function and age. *Eur J of Nutr.* 2005, 44(8): 465-84, 2005.

Keating E, Correia-Branco A, Araújo JR, Meireles M, Fernandes R, Guardão L, Guimarães JT, Martel F, Calhau C. Excess perigestational folic acid exposure induces metabolic dysfunction in post-natal life. *J Endocrinol.* 2015;224(3):245-59.

Kim JM, Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Yoon JS. Predictive value of folate, vitamin B12 and homocysteine levels in late-life depression. *Br J Psychiatry*. 2008; 192(4):268-74.

Kim KC, Friso S, Choi SW. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J Nutr Biochem*. 2009; 20(12):917-26.

Komulainen P, Lakka TA, Kivipelto M, Hassinen M, Penttilä IM, Helkala EL, Gylling H, Nissinen A, Rauramaa R. Serum High sensitivity C-reactive protein and cognitive function in elderly women. *Age Ageing* 2007; 36(4): 443-48.

Kronenberg G, Colla M, Endres M. 2009. Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease. *Curr Mol Med*. 2009; 9 (3): 315-323.

Kronenberg G, Harms C, Sobol RW, Cardozo-Pelaez F, Linhart H, Winter B, Balkaya M, Gertz K, Gay SB, Cox D, Eckart S, Ahmadi M, Juckel G, Kempermann G, Hellweg R, Sohr R, Hörtnagl H, Wilson SH, Jaenisch R, Endres M. Folate deficiency induces neurodegeneration and brain dysfunction in mice lacking uracil DNA glycosylase. *J Neurosci*. 2008; 28(28):7219-30.

Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002; 22(5):1752-62.

Létondor A, Buaud B, Vaysse C, Richard E, Layé S, Pallet V, Alfos S. EPA/DHA and Vitamin A Supplementation Improves Spatial Memory and Alleviates the Age-related Decrease in Hippocampal RXR γ and Kinase Expression in Rats. *Front Aging Neurosci*. 2016; 8:103.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-17.

Lynch AM, Lynch MA. The age-related increase in IL-1 type I receptor in rat hippocampus is coupled with an increase in caspase-3 activation. *Eur J Neurosci*. 2002 Jun;15(11):1779-88.

Macedo C, Gazzola J, Najas M. Síndrome da fragilidade no idoso: importância da fisioterapia. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*. 2009;33(3):177-84.

Malloy-Diniz LF, Fuentes D, Sedó M, Leite WB. Neuropsicologia das funções executivas. In: Fluentes D, Malloy-Diniz LF, Camargo C, Cozenza R (Orgs). *Neuropsicologia – teoria e prática*. Porto Alegre: Artmed; 2008, p 187-206.

McGuire LC; Ford ES; Ajani UA. Cognitive functioning as a predictor of functional disability in later life. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2006;14: 36-42.

McKay JA, Williams EA, Mathers JC. Folate and DNA methylation during in utero development and aging. *Biochem Soc Trans*. 2004; 32(Pt 6):1006-7.

Mendelsohn AR, Larrick JW. Epigenetic-mediated decline in synaptic plasticity during aging. *Rejuvenation Res*. 2012; 15(1):98-101.

Michelakos T, Kousoulis AA, Katsiardanis K, Dessypris N, Anastasiou A, Katsiardani KP, Kanavidis P, Stefanadis C, Papadopoulos FC, Petridou ET. Serum folate and B12 levels in association with cognitive impairment among seniors: results from the VELESTINO study in Greece and meta-analysis. *J Aging Health*. 2013; 25(4):589-616.

Minciullo PL, Catalano A, Mandraffino G, Casciaro M, Crucitti A, Maltese G, Morabito N, Lasco A, Gangemi S, Basile G. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016; 64(2):111-26.

Mishto M. Immunoproteasomes and immunosenescence. *Rev Ageing Res*. 2003; 2(4):13.

Morgan TE, Xie Z, Goldsmith S, Yoshida T, Lanzrein AS, Stone D, Rozovsky I, Perry G, Smith MA, Finch CE. The mosaic of brain glial hyperactivity during normal ageing and its attenuation by food restriction. *Neuroscience*. 1999;89(3):687-99.

Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment

in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(1):193-200.

Morrison JH, Baxter MG. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(4):240-50.

Müller, O; Krawinkel, M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ.* 2005;173 (3):279-286.

Najjar S, Pearlman DM, Devinsky O, Najjar A, Zagzag D. Neurovascular unit dysfunction with blood-brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: a review of clinical and experimental evidence. *J Neuroinflammation.* 2013;10:142.

Navarro A, Sánchez Del Pino MJ, Gómez C, Peralta JL, Boveris A. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282(4):R985-92.

Neese SL, Pisani SL, Doerge DR, Helferich WG, Sepehr E, Chittiboyina AG, Rotte SC, Smillie TJ, Khan IA, Korol DL, Schantz SL. The effects of dietary treatment with S-equol on learning and memory processes in middle-aged ovariectomized rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2014; 41:80-8.

Nilsson LG, Bäckman L, Nyberg L, Erngrund K, Adolfsson R, Bucht G, Karlsson S, Widing, G, Wildblad B. The Betula prospective cohort study: Memory, health, and aging. *Aging, Neuropsychology and Cognition.* 1997; 4:1-32.

Oliveira CMB, Sakata RK, TSA, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Rev Bras Anestesiologia.* 2011; 6: 255-265.

Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun.* 2012;26:383-92.

Padovani RM, Amaya-Farfan J, Colugnati FAB, Domene SMA. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. *Rev Nutr.* 2006;19(6):741-60.

Parente, MAMP. (colaboradores). *Cognição e envelhecimento*. Porto Alegre: Artmed. 2006; 312p.

Park D, Schwarz, N. *Cognitive Aging: A Primer*. 2000; New York: Psychology Press.

Park DC, Festini SB. *Theories of Memory and Aging: A Look at the Past and a Glimpse of the Future*. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 2016.

Parker SE, Yazdy MM, Tinker SC, Mitchell AA, Werler MM: The impact of folic acid intake on the association among diabetes mellitus, obesity, and spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 2013, 209:239.e1-8.

Partearroyo T, Pérez-Miguelsanz J, Peña-Melián Á, Maestro-de-Las-Casas C, Úbeda N, Varela-Moreiras G. Low and high dietary folic acid levels perturb postnatal cerebellar morphology in growing rats. *Br J Nutr*. 2016; 115(11):1967-77.

Penna AG. *Introdução à aprendizagem e memória*. Rio de Janeiro: Imago, 2001.

Persad VL, Van den Hof MC, Dubé JM, Zimmer P. Incidence of open neural tube defects in Nova Scotia after folic acid fortification. *CMAJ*. 2002;167(3):241-5.

Pieramico V, Esposito R, Cesinaro S, Frazzini V, Sensi SL. Effects of non-pharmacological or pharmacological interventions on cognition and brain plasticity of aging individuals. *Front Syst Neurosci*. 2014; 8:153.

Popa-Wagner A, Stöcker K, Balseanu AT, Rogalewski A, Diederich K, Minnerup J, Margaritescu C, Schäbitz WR. Effects of granulocyte-colony stimulating factor after stroke in aged rats. *Stroke*. 2010; 41(5):1027-31.

Possin KL, Brambati SM, Rosen HJ, Johnson JK, Pa J, Weiner MW, Miller BL, Kramer JH. Rule violation errors are associated with right lateral prefrontal cortex atrophy in neurodegenerative disease. *J Int Neuropsychol Soc*. 2009; 15(3):354-64.

Quevedo, J, Martins MR, Izquierdo I. (2006). Alterações Cerebrais e Memória. In Bottino, C. M. C., Laks, J., & Blay, S.L. (Orgs.). Demência e transtornos cognitivos em idosos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006 (p. 3-12).

Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, Porcellini E, Licastro F. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82(3):636-43.

Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, , Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience.* 2015;300:141-54.

Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol.* 2006; 5(11):949-60.

Reynolds EH. Folic acid, ageing, depression, and dementia. *BMJ.* 2002;324(7352):1512-5

Robins Wahlin TB, Wahlin A, Winblad B, Bäckman L. The influence of serum vitamin B12 and folate status on cognitive functioning in very old age. *Biol Psychol.* 2001; 56(3):247-65.

Royall DR, Palmer R, Chiodo LK, Polk MJ. Normal rates of cognitive change in successful aging: the freedom house study. *J Int Neuropsychol Soc.* 2005;11(7):899-909.

Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenic obesity and endocrinal adaptation with age. *Int J Endocrinol.* 2013; 204 164.

Salthouse T. Consequences of age-related cognitive declines. *Annu Ver Psychol.* 2012; 63:201–26.

Salthouse TA. When does age-related cognitive decline begin? *Neurobiol Aging.* 2009; 30:507–14.

Santos LMP; Pereira MZ. Efeito da fortifi cação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. *Cad. Saúde Pública.* 2007;23(1):17-24.

Sawaengsri H, Wang J, Reginaldo C, Steluti J, Wu D, Meydani SN, Selhub J, Paul L. High folic acid intake reduces natural killer cell cytotoxicity in aged mice. *J Nutr Biochem*. 2016; 30:102-7.

Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(5 Suppl):1295S-303S.

Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(2):614S-620S.

Selhub J, Rosenberg IH. Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome. *Biochimie*. 2016; 126:71-8.

Shea TB, Rogers E. Has prenatal folate supplementation established an at-risk population for age-related cognitive decline? *J Alzheimers Dis*. 2014; 41(3):667-9.

Singh R, Kanwar SS, Sood PK, Nehru B. Beneficial effects of folic acid on enhancement of memory and antioxidant status in aged rat brain. *Cell Mol Neurobiol*. 2011; 31(1):83-91.

Singh-Manoux A, Kivimaki M, Glymour MM, Elbaz A, Berr C, Ebmeier KP, et al. Timing of onset of cognitive decline: results from Whitehall II prospective cohort study. *BMJ*. 2012; 344:d7622.

Siqueira IR, Fochesatto C, Andrade A, Santos M, Hagen M, Bello-klein A, Netto CA. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int J Dev Neurosci*. 2005;23(8):663-71.

Smiljanic K, Pesic V, Mladenovic Djordjevic A, Pavkovic Z, Brkic M, Ruzdijic S, Kanazir S. Long-term dietary restriction differentially affects the expression of BDNF and its receptors in the cortex and hippocampus of middle-aged and aged male rats. *Biogerontology*. 2015; 16(1):71-83.

Sousa VMC; Guariento ME. Avaliação do idoso desnutrido. *Rev Bras Clin Med*. 2009;7:46-49.

Stebbins GT, Carrillo MC, Dorfman J, Dirksen C, Desmond JE, Turner DA, Bennett DA, Wilson RS, Glover G, Gabrieli JD. Aging effects on

memory encoding in the frontal lobes. *Psychol Aging*. 2002 17(1): 44-55.

Stertz L, Magalhães PV, Kapczinski F. Is bipolar disorder an inflammatory condition? The relevance of microglial activation. *Curr Opin Psychiatry*. 2013;26:19-26.

Stranahan AM, Hao S, Dey A, Yu X, Baban B. Blood-brain barrier breakdown promotes macrophage infiltration and cognitive impairment in leptin receptor-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016.

Syslová K, Böhmoverá A, Mikoska M, Kusma M, Pelclová D, Kačer P. Multimarker Screening of Oxidative Stress in Agingement o folder people: self-monitoring and instrumental activities of daily living. *Gerontologist*. 1969;9:179-86.

Tamai, S. *Epidemiologia do Envelhecimento no Brasil*. Em O. V. Forlenza, & O. P. Almeida. *Depressão e Demência no Idoso – Tratamento Psicológico e Farmacológico*. São Paulo: Lemos,1997.

Theoharides TC, Zhang B. Neuro-inflammation, blood-brain barrier, seizures and autism. *J Neuroinflammation* 2011;8:168.

Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry*. 2002; 159(12):2099-101.

Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*. 2001;108(1):15-23.

Tomizawa H, Matsuzawa D, Ishii D, Matsuda S, Kawai K, Mashimo Y, Sutoh C, Shimizu E. Methyl-donor deficiency in adolescence affects memory and epigenetic status in the mouse hippocampus. *Genes Brain Behav*. 2015; 14(3):301-9.

Tonet A, Karnikowski M, Moraes C, Gomes L, Karnikowshi M, Cordova C. Association between the -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41:47-53.

Trindade APNT, Barboza MA, Oliveira FB, Borges APO. Repercussão do declínio cognitivo na capacidade funcional em idosos institucionalizados e não institucionalizados. *Fisioter. Mov.* 2013;26(2): 281-289.

Troen AM, Mitchell B, Sorensen B, Wener MH, Johnston A, Wood B, Selhub J, McTiernan A, Yasui Y, Oral E, Potter JD, Ulrich CM. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. *J Nutr.* 2006; 136(1):189-94.

Troulinaki K, Tavernarakis N. Neurodegenerative conditions associated with ageing: a molecular interplay? *Mech Ageing Dev.* 2005;126(1):23-33.

Tulving E. Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol.* 2002;53:1.

Tulving E. Multiple memory systems and consciousness. *Hum Neurobiol.* 1987 6(2): 67-80.

Uehara SH, Rosa G. Associação da deficiência de ácido fólico com alterações patológicas e estratégias para sua prevenção: uma visão crítica. *Rev Nutr.* 2010;23(5):881-94.

Van Ort FV, Melse-Boonstra A, Brouwer IA, Clarke R, West CE, Katan MB, Verhoef P. Folic acid and reduction of plasma homocysteine concentrations in older adults: a dose-response study. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(5):1318-23.

Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev.* 2007; 128(1):83-91.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000; 7(5):333-40.

Vila-Luna S, Cabrera-Isidoro S, Vila-Luna L, Juárez-Díaz I, Bata-García JL, Alvarez-Cervera FJ, Zapata-Vázquez RE, Arankowsky-Sandoval G, Heredia-López F, Flores G, Góngora-Alfaro JL. Chronic caffeine consumption prevents cognitive decline from young to middle age in rats, and is associated with increased length, branching, and spine density of basal dendrites in CA1 hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2012; 202:384-95.

Von Bernhardi R, Tichauer JE, Eugenín J. Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *J Neurochem*. 2010; 112(5):1099-114.

Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrients*. 2016; 8(6).

Walker JG, Batterham PJ, Mackinnon AJ, Jorm AF, Hickie I, Fenech M, Kljakovic M, Crisp D, Christensen H. Oral folic acid and vitamin B-12 supplementation to prevent cognitive decline in community-dwelling older adults with depressive symptoms: the Beyond Ageing Project: a randomized controlled Trial. *Am J Clin Nutr*. 2012;96:194–203.

Weaver JD, Huang M-H, Albert M, Harris T, Rowe JW, Seeman TE. Interleukin-6 and risk of cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology*. 2002; 59(3):371-8.

Weinstock M, Luques L, Poltyrev T, Bejar C, Shoham S. Ladostigil prevents age-related glial activation and spatial memory deficits in rats. *Neurobiol Aging*. 2011; 32(6):1069-78.

Wells JL, Dumbrell AC. Nutrition and aging: assessment and treatment of compromised nutritional status in frail elderly patients. *Clin Interv Aging*. 2006;1(1):67-79.

Williams JBW, Gibbon M, First MB, Spitzer RL, Davis M, Borus J, Howes MJ, Kane J, Pope HG, Rounsaville B, Wittchen H: The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID) II. Multi-site test-retest reliability. *Arch Gen Psychiatry*, 1992; 49:630-636.

World Health Organization (WHO). [Acesso em 2015, abril20]. Disponível em <http://www.who.int/es/>

Wyss JM, Chambless BD, Kadish Ivan Groen T. Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences. *Neurobiol Aging*. 2000; 21:671–81.

Yaffe K, Blackwell T, Kanaya AM, Davidowitz N, Barrett-Connor E, Krueger K. Diabetes, impaired fasting glucose, and development of cognitive impairment in older women. *Neurology*. 2004;63(4):658-63.

Yin F, Sancheti H, Patil I, Cadenas E. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2016.

Zhang Y, Zhang Y, Chen M, Zhou Y, Lang M. Galactosylated poly(ϵ -caprolactone) membrane promoted liver-specific functions of HepG2 cells in vitro. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;1(41):52-8.

Zhao M, Chen YH, Chen X, Dong XT, Zhou J, Wang H, Wu SX, Zhang C, Xu DX. Folic acid supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced neural tube defects in mice. *Toxicol Lett*. 2014; 224(2):201-8.



Zhao M, Chen YH, Dong XT, Zhou J, Chen X, Wang H, Wu SX, Xia MZ, Zhang C, Xu DX. Folic acid protects against lipopolysaccharide-induced preterm delivery and intrauterine growth restriction through its anti-inflammatory effect in mice. *PLoS One*. 2013; 8(12):e82713.

Zhao Q, Peng C, Wu X, Chen Y, Wang C, You Z. Maternal sleep deprivation inhibits hippocampal neurogenesis associated with inflammatory response in young offspring rats. *Neurobiol Dis*. 2014; 68:57-65.

Zugno AI, Canevar L, Heylmann AS, Wessler PG, Steckert A, Mastella GA, de Oliveira MB, Damázio LS, Pacheco FD, Calixto OP, Pereira FP, Macan TP, Pedro TH, Schuck PF, Quevedo J, Budni J. Effect of folic acid on oxidative stress and behavioral changes in the animal model of schizophrenia induced by ketamine. *J Psychiatr Res*. 2016; 81:23-35.

ANEXOS

Anexo A: Carta de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

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

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

Protocolo: 100-2014-01

Professor responsável: Alexandra Ioppi Zugno

Equipe: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Lara Canever, Alexandra S. A. Heylmann, Sullivan A. Citadin, Luiz Antônio De Luca, Mariana B. de Oliveira, Adalberto Alves de Castro

Título: "Efeito da deficiência e/ou suplementação de ácido fólico materno e na prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina"

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 600 Ratos Wistar de 60 dias pesando aproximadamente 300g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

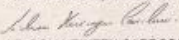
The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 100-2014-01
Principal Investigator: Alexandra Ioppi Zugno
Researchers: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Lara Canever, Alexandra S. A. Heylmann, Sullivan A. Citadin, Luiz Antônio De Luca, Mariana B. de Oliveira, Adalberto Alves de Castro

Project title: "Effects of deficiency and/or maternal folic acid supplementation and in the adult offspring subjected to the animal model of schizophrenia induced by ketamine".

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

Criciúma, 16 de junho de 2014.


VILSON HEIZEN CARDOSO
 Coordenador Adjunto da CEUA


1

Anexo B: Tabela de composição nutricional da Dieta AIN 93 ou controle.

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula									
Pedido						PRAGSOLUÇÕES biociências ▲▼			
Cliente	Lara Canever	UNESC							
Data	11/07/2014								
Validade	06/10/2014 Em geladeira	07/01/2015 Em freezer							
Manipulador									
Formula	Dieta AIN 93 M								
Dose (g ou ml)	20.300	Vezes:		5 X					
Dose (Kg ou L)	20.30								
Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) qsp	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	46,57000%	CornProducts	1	834088	19/08/15	9.453,71	9.453,71	
	CASEINA	14,00000%	China		HL 13058	31/12/14	2.842,000	2.842,000	
	AMIDO DEXTRINIZADO	15,50000%	CornProducts	1	717183	06/10/14	3.146,500	3.146,500	
	SACAROSE	10,00000%	GA	1	708	27/05/16	2.030,000	2.030,000	
	OLEO DE MILHO	4,00000%	Bunge	1	L1213	19/08/14	812,000	812,000	
	CELLULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%	Famos	1	D23276	30/07/17	1.015,000	1.015,000	
	MIX MINERAL AIN 93 M	3,50000%	PragSoluções	1	030814	03/06/15	710,500	710,500	
	MIX VIT AIN 93	1,00000%	PragSoluções	1	040714	04/07/15	203,000	203,000	
	L Cistina	0,1800%	Pharma Nostra	1	130710	30/07/2015	36,540	36,540	
	BITARTARATO DE COLINA	0,2500%	Fragon	1	1211088	17/11/15	50,750	50,750	
	BHT	0,0008%	Officialis	1			0,162	0,162	
		100,00080%					20,300	20,300	
dilucioes: 1/0000 em sacarose			Manipulado:			Aprovado:			
OBS: Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.									

Fonte: Tabela adaptada de Pragsoluções Biociências (www.pragsolucoes.com.br).

Anexo C: Tabela de composição nutricional da Dieta deficiente em ácido fólico.

Quantidades produzidas de cada substância na fórmula										
Pedido		Lara Canever		UNESC						
Data		11/07/2014								
Validade		09/10/2014 Em geladeira		07/01/2015 Em freezer						
Manipulador										
Formula		Dieta AIN 93 M - Mod Deficiente Acido Folico								
Dose (g ou ml)		20,500		Vezes:		2 X				
Dose (Kg ou L)		20,50								
Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) gsp	Verif	OK
	AMIDO DE MILHO	46,570000%	ComProducts	1	834088	19/08/15	9.546,85	9.546,85		
	CASEINA	14,000000%	China	1	HL 13058	31/12/14	2.870,000	2.870,000		
	AMIDO DEXTRINIZADO	15,500000%	ComProducts	1	717183	06/10/14	3.177,500	3.177,500		
	SACAROSE	10,000000%	GA	1	708	27/05/16	2.050,000	2.050,000		
	OLEO DE SOJA	4,000000%	Bunge	1	L1213	18/09/14	820,000	820,000		
	CELLULOSE MICROCRISTALINA	5,000000%	Farmoc	1	023279	30/07/17	1.025,000	1.025,000		
	MIX MINERAL AIN 93 M	3,500000%	PragSoluções	1	030614	03/06/15	717,500	717,500		
	MIX VIT. AIN Mod. % Ac. Folico	1,000000%	PragSoluções	1	110714	11/07/15	205,000	205,000		
	L Cistina	0,18000%	Pharma Nostra	1	130710	30/07/2015	36,900	36,900		
	BITARTARATO DE COLINA	0,25000%	Fragon	1	1211086	17/11/15	51,250	51,250		
	CORANTE VERMELHO									
	BHT	0,0008%	Oficialis	1			0,164	0,164		
		100,00080%					20,500	20,500		
diluidores: 1/0000 em sacarose										
Manipulador:		Aprovado:								
OBS: Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.										
Corante vermelho na água										

Fonte: Tabela adaptada de Pragsoluções Biociências (www.pragsolucoes.com.br).

Anexo D: Tabela de composição nutricional da ração comum (padrão) oferecida aos animais no Biotério.

PRAGSOLUÇÕES biociências ▲▼		
Composição do Produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.		
Níveis de Garantia por Quilograma do Produto:		
Umidade (máx)	12,50	%
Proteína Bruta (mín)	22,00	%
Extrato Etéreo (mín)	4,50	%
Matéria Mineral (máx)	10,00	%
Matéria Fibrosa (máx)	8,00	%
Cálcio (máx)	1,40	%
Fósforo (mín)	0,80	%
Enriquecimento por Quilograma do Produto:		
Vitaminas: Vitamina A 12.000,00 UI; vitamina D3 1.800,00 UI; vitamina E 30,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; vitamina B1 5,00 mg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00 mg; vitamina B12 20,00 mg; niacina 60,00 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; ácido fólico 1,00 mg; biotina 0,05 mg; colina 600,00 mg.		
Microelementos Minerais: Ferro 50,00 mg; zinco 60,00 mg; cobre 10,00 mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,50 mg.		
Aminoácidos: Lisina 100,00 mg; metionina 300,00 mg.		
Aditivos: Antioxidante 100,00 mg.		

Fonte: Tabela adaptada de Pragsoluções Biociências (www.pragsolucoes.com.br).