

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SABRINA DA SILVA

**ANÁLISE DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE OURO EM MODELOS DE DEMÊNCIA**

CRICIÚMA
JUNHO / 2018

SABRINA DA SILVA

**ANÁLISE DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE OURO EM MODELOS DE DEMÊNCIA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde para a obtenção do
título de doutora em Ciências da Saúde.
Orientador: Professor Dr. Alexandre P. Muller
Coorientador: Professor Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

CRICIÚMA,

JUNHO / 2018

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver, adaptado pelo PPGCS Resolução n. 07/2015. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Dedico a todas as pessoas que me ajudaram, não só agora, mas desde o começo da minha vida, embora não foram muitas pessoas, mas cada uma delas tem conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por ter me dado a vida e por estar me amparando para que eu consiga concluir essa etapa tão importante nesse momento delicado de saúde que venho passando.

Aos meus pais, Renato da Silva e Rejane Cruz da Silva, agradeço todo o amor, carinho, compreensão e principalmente agradeço a base da minha educação. Sem vocês nada seria possível, amo vocês infinitamente.

Às minhas irmãs Samantha, Gabriella e Isaac, pelo carinho de todos os dias, e ao meu Irmão Ismael, mesmo distante, do seu modo demonstra seu amor pela gente. Amo vocês imensamente

Agradeço imensamente ao meu esposo Kleberson Barbosa, que tem me amparado e compreendido por todo esse processo nada fácil que é um doutorado. Te amo meu amor, desde.....sempre.

Agradeço a minha sogra Dolores por cada carinho que demonstrou com suas deliciosas preparações e por entender sempre que precisamos ficar em casa.

Agradeço a minha tia Leila, sem ela não teria conseguido dar o primeiro passo dessa jornada, a matrícula. Obrigada mais uma vez, te amo.

Aos amigos que fiz nestes últimos anos e aos que revi de outros tempos. Aos amigos do dia a dia, aos IC's que sem eles nada é possível, aos colegas que trocamos experiências, obrigada LAFIBE.

A todos os meus amigos que entenderam a distância e a minha correria, incluindo minha falta de atenção nos últimos tempos, mas que moram no meu coração.

Aos professores com quem tive a oportunidade de aprender muito

nas disciplinas ofertadas, muito mais que professores, amigos e parceiros.

Agradeço muito à equipe do biotério, principalmente ao Heron, Deivid, Sandra e Dona Elige que sempre me socorreram nos experimentos, e além disso a amizade que construímos nesses anos que passaram voando.

Agradeço ao professor Dr. Marcos Marques da Silva Paula, do laboratório de Processos Inflamatórios e Metabólicos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, que gentilmente cedeu a NPAu para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao professor Ricardo Pinho por todo carinho e dedicação nos momentos em que eu precisei, muito obrigada.

Ao professor Claudio de Souza que me apresentou a esse mundo da pesquisa, sem os ensinamentos dele tudo seria mais difícil nesse caminho, muito obrigada.

Ao professor Paulo Silveira por aceitar ser meu Coorientador, meu muito obrigado, meu querido amigo de tantos anos.

Agradeço a banca que se faz presente nesse momento tão especial Prof. Ricardo, Prof^a Vanessa, Prof^a Silvia e Prof. Rafael.

Agradeço a professora Josiane Budni, que mesmo nos momentos mais difíceis esteve presente, meu sincero agradecimento, sem você não teria chegado ao doutorado, você foi a base para esse momento tão importante.

E finalmente ao meu orientador Alexandre P. Muller, que foi muito além de um orientador nesses 4 anos que se passaram, foi um amigo que só lutou pelo meu crescimento profissional, meu muito obrigado.

"E o que nós pensamos que sabemos que nos impede de aprender."

Claude Bernard

RESUMO

Demência é uma síndrome caracterizada por diminuição progressiva da capacidade cognitiva do indivíduo. Dentre as principais demências, tem a doença de Alzheimer (DA), associada a déficits cognitivos e distúrbios neurodegenerativos. Atualmente, as intervenções terapêuticas para a DA não são efetivas. Sendo assim, tratamentos que visem atuação em estágios mais iniciais da doença são necessários para que se possa tentar modificar o prognóstico da patologia. A fisiopatologia inclui a perda sináptica, aumento de placas senis constituídas de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) extracelular e aumento de emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos por agregados da proteína Tau hiperfosforilada, uma proteína estabilizadora dos microtúbulos. Além disso, acredita-se que a disfunção cognitiva possa estar associada à neuroinflamação, desencadeando uma resposta complexa da microglia, levando ao aumento da fagocitose dos neurônios no hipocampo, que culmina na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e morte neuronal, com consequente comprometimento da memória. O objetivo deste trabalho foi avaliar a segurança do tratamento com nanopartículas de ouro (NPAu) em modelos de demência sobre parâmetros de cognição, inflamação e metabolismo. Após testar dois tempos de intervalo de uso de NPAu 24 e 48 horas, determinou-se que o uso de NPAu na dose de 2,5mg/kg tamanho de 20nm aplicado a cada 48h durante 21 dias era mais seguro. Dois modelos de demência foram utilizados para induzir alterações fisiológicas semelhantes as que são encontradas em pacientes com DA. O modelo de estrepzotocina (STZ) 3mg via intracerebroventricular (ICV) que induz uma resistência à sinalização da insulina em regiões cerebrais associadas à aprendizagem e a memória levando à uma disfunção cognitiva, prejuízo no metabolismo energético, aumento do estresse oxidativo, hiperfosforilação da proteína Tau e aumento de $A\beta$ e o modelo de ácido ocadáico (AO) na dose de 100ug via ICV, que induz hiperfosforilação da proteína Tau e um aumento na produção de $A\beta$ causando dano cognitivo, dano de memória e neurodegeneração decorrente do acúmulo de emaranhados fibrilares e placas beta. O tratamento com NPAu na dose 2,5mg/kg por via intraperitoneal (IP), com intervalo entre uma dose e outra de 48hs iniciou 24h após indução dos modelos de demência proposto. As NPAu foram capazes de prevenir o dano mitocondrial e manter o status energético cerebral bem como prevenir o déficit cognitivo induzido no modelo de resistência cerebral à insulina. Além disso no modelo de taupatia, modulou a atividade da ATP sintase e ativou a microglia, possivelmente para um fenótipo neuroprotetor, mostrando um efeito que ainda não havia sido demonstrado desta molécula. O trabalho propôs investigar o efeito das NPAu como um possível antioxidante para ajudar no tratamento para as demências, principalmente a DA, considerando que esta molécula apresenta características antioxidante e anti-inflamatórias, e essas características estão presentes na etiologia da DA. No entanto, mais estudos são necessários para descartar qualquer efeito colateral que nosso trabalho no conseguiu observar.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro; Demência; Resistência Insulina Cerebral, Taupatia.

ABSTRACT

Dementia is a syndrome characterized by increasing the cognitive ability of the individual. Among the main dementias, it has Alzheimer's disease (AD), associated with cognitive deficits and neurodegenerative disorders. Currently, the therapeutic operations for AD are not effective. Thus, treatments that are having more recent operations are more demanding for the pathology prognosis program. Pathophysiology includes synaptic loss, increased senile plaques made up of extracellular β -amyloid peptide ($A\beta$), and increased intracellular neurofibrillary by hyperphosphorylated Tau protein, a microtubule-stabilizing protein. In addition, it is believed that cognitive dysfunction may be associated with neuroinflammation, triggering a complex microglia response, leading to increased phagocytosis of non-hippocampal neurons, culminating in the production of reactive oxygen species (ROS) and neuronal death, with consequent memory impairment. The objective of this work was to investigate the use of nanoparticles of gold (GNP) in the model of dementia about parameters of cognition, inflammation and metabolism. After two-time GNP use interval testing at 24 and 48 hours, it was determined that the use of GNP at the dose of 2.5mg / kg size of 20nm applied every 48 hours for 21 days was safer. Dementia models were used to induce the physiological effects similar to those found in patients with AD. The model of streptozotocin (STZ) 3mg via intracerebroventricular (ICV), which induced resistance to insulin signaling in brain regions associated with learning and the activation of cognitive dysfunction without energetic metabolism, increased oxidative stress, hyperphosphorylation of Tau protein and increase of $A\beta$ and octadecanoic acid (AO) at the 100ug dose via ICV, which is a hyperphosphorylation of the protein and an increase in the production of cognitive fatty acids, memory damage and neurodegeneration due to the accumulation of fibrillar tangles and beta plaques . GNP treatment at 2.5 mg / kg intraperitoneally (IP) can be initiated in one dose and another 48 hours starting 24 hours after the indication of the dementia models presented. GNP was able to prevent mitochondrial damage and maintain brain energetic state as preventing cognitive deficit induced in the insulin resistance model of the brain. In addition, there was no tuppahy model, modulated ATP synthase activity and produced a microglia, possibly for a neuroprotective phenotype, with a different effect from that which was temperate. The aim of this study was to investigate the effect of GNP as a possible anti-oxidant to help treat dementias, especially AD, since this molecule has antioxidant and anti-inflammatory properties and those that are present in the etiology of AD. However, more studies are needed to rule out any side effects that our work failed to observe.

Keywords: Gold nanoparticles; Insanity; Brain Insulin Resistance, Taupatia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de dano neural e ativação microglial.....	19
Figura 2: Sinalização de insulina do cérebro acometido pela Doença de Alzheimer (DA).....	23
Figura 3: Estrutura química e mecanismo do Ácido Ocadáico (AO) induzindo Neurotoxicidade.....	25
Figura 4: Aparelho para realização do teste de Barnes Maze.....	33
Figura 5: Aparelho para realização do teste de Water Maze.....	34
Figura 6: Aparelho para realização do teste de reconhecimento de objetos.....	35
Figura 7: Histologia Hepática.....	38
Figura 8: Função mitocondrial modelo STZ.....	40
Figura 9: A memória espacial avaliada pelo teste de Barnes Maze.....	41
Figura 10: Teste de Reconhecimento de objetos.....	42
Figura 11: A memória espacial avaliada pelo teste de Water Maze.....	43
Figura 12: Avaliação dos fatores tróficos.....	44
Figura 13: Avaliação dos marcadores inflamatórios.....	46
Figura 14: Função mitocondrial modelo AO.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E FÓRMULAS QUÍMICA

AA – Ácido Araquidônico

AChE – Acetilcolinesterase

ADP – Adenosina difosfato

ALT/TGP – aspartato aminotransferase / transaminase glutâmico oxaloacetato

ANOVA – análise de variância

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AO – Ácido Ocadáico

AP2 – Ativação da Proteína 2

APP – Proteína precursora amiloide

AST/TGO – alanina aminotransferase / transaminase glutamina pirúvica

ATP – Adenosina Trifosfato

A β – Beta-amiloide

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BHE – Barreira Hematoencefálica

Ca²⁺ - Íon de Cálcio

CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais

ChAT – Acetil Colina Transferase

CTE – Cadeia de transporte de elétrons

DA – Doença de Alzheimer

DMII – Diabetes Melitus 2

EF2 – Fator de Alongamento 2

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GSH – Glutathiona Reduzida

GSK3 β – Glicogênio sintase quinase 3 beta

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HAuCL₄ – Ácido tetracloroáurico

IChE – Enzima acetilcolinesterase

ICV – Intracerebroventricular

IFN- γ – Interferon-gama

IL (1 β , 4 e 6) – Interleucina-(1 β , 4 e 6)

I κ β -kinase – I kappa beta kinase

LPS – Lipopolissacarídeo

NAD (+) – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina Oxidado

NADH – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina Reduzido

NF κ β – Fator de Transcrição Kappa Beta

NGF - Fator de crescimento neural

NMDA – N-Metil-D-aspartato

NPAu – Nanopartículas de Ouro

O₂⁻ - Radical Ânion Superóxido

OMS – Organização Mundial da Saúde

PIM – Proteína Inflamatória de Macrófagos

PP 1/2A – Proteína Fosfatase

SBNeC – Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

Ser/Thr – Serina / treonina

SNC – Sistema Nervoso Central

STZ – Estreptozotocina

TGF β - Fator de transformação do crescimento beta

TNF α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 DEMÊNCIA.....	14
1.1.1 Demência tipo Doença de Alzheimer (DA).....	15
1.2 ALZHEIMER E INFLAMAÇÃO.....	17
1.3 ALZHEIMER, FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	20
1.4 MODELOS DE INDUÇÃO DE DEMÊNCIA.....	22
1.4.1 Modelo animal de demência por estreptozotocina (STZ).....	22
1.4.2 Modelo animal de demência por Ácido Ocadáico (AO).....	23
1.5 TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO (NPAu).....	25
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 ANIMAIS.....	30
3.2 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E USO DAS NPAu.....	30
3.3 ADMINISTRAÇÃO DE NPAu E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
3.3.1 Protocolo para padronização do melhor intervalo de administração da NPAu.....	31
3.3.2 Protocolo para os modelos de demência.....	31
3.4 MODELO ANIMAL TIPO-DA POR ESTREPTOZOTOCINA.....	31
3.5 MODELO ANIMAL TIPO-DA POR ACIDO OCADÁICO.....	32
3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	32
3.6.1 Barnes Maze.....	32
3.6.2 Water Maze.....	33
3.6.3 Reconhecimento de Objetos.....	34
3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	35
3.8 PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂	35

3.9 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$).....	36
.....	
3.10 HISTOLOGIA.....	36
3.11 MARCADORES DE FÍGADO E SANGUE.....	36
3.12 MARCADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS.....	37
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 HISTOLOGIA HEPÁTICA E MARCADORES DE DANO CELULAR.....	38
4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE STZ E TRATAMENTO COM NPAu.....	39
4.3 EFEITO DO STZ E DO TRATAMENTO COM NPAu EM DIFERENTES TIPOS DE MEMÓRIA.....	41
4.4 EFEITOS DO TRATAMENTO COM NPAu EM MODELO DE DEMÊNCIA INDUZIDO POR ACIDO OCADAICO.....	42
4.5 AVALIAÇÕES DOS EFEITOS DAS NPAu EM FATORES TRÓFICOS E ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO.....	44
4.6 MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	45
4.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE AO E TRATAMENTO COM NPAu.....	47
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO.....	59
7 PERSPECTIVAS.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEMÊNCIA

Demência é uma síndrome caracterizada por diminuição progressiva da capacidade cognitiva do indivíduo (que inclui memória, linguagem e abstração, entre outros domínios), o que prejudica seu desempenho na realização das atividades diárias. O indivíduo com demência torna-se cada vez mais, dependente de terceiros para a vida em sociedade e para seus cuidados. De acordo com a OMS (2012), o número de pessoas vivendo com demência no mundo é de aproximadamente 35,6 milhões (OMS, 2012). Esse número deve dobrar até 2030 e mais do que triplicará em 2050. Projeta-se um custo anual em 2050 de 600 bilhões de dólares no cuidado dos pacientes com demência, e até o momento não existem medicamentos eficazes no tratamento da maioria dessas doenças (Custódio et al., 2017)

Atualmente encontramos demência do tipo vascular, demência dos corpúsculos de Lewy, demência frontotemporais e demência tipo doença de Alzheimer (DA) (Villemagne et al., 2018), entre outras. A DA é a demência mais prevalente, sendo responsável por até 70% dos diagnósticos. Na América Latina estima-se que chegará a 50 milhões de pessoas diagnosticadas com demência em 2050, e seguindo dados mundiais, países como Brasil, Cuba, Chile, Peru e Venezuela a DA terá prevalência de 55,1% desses diagnósticos (Custódio et al., 2017). A DA é considerada uma epidemia mundial e apesar do grande número de estudos e aumento no conhecimento da doença, nenhum tratamento modificador dela realmente eficaz foi produzido (Lanea et al., 2018), portanto o desenvolvimento de novos fármacos com potencial terapêutico se faz necessário. No curso da DA, cerca de 80% dos neurônios hipocampais morrem e os sintomas progressivos da DA se manifestam como distúrbios cognitivos graves. É uma doença extremamente debilitante, associada a intenso sofrimento para o paciente, incluindo prejuízo funcional progressivo, perda da independência e sintomas comportamentais (Galvin e Sadowsky, 2012; Muller et al., 2013).

1.1.1 Demência tipo Doença de Alzheimer (DA)

A DA é a principal demência hoje encontrada no mundo, foi descrita pela primeira vez em 1907 por Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907; Kidd, 1963; Selkoe, 2001), através de observações de análises histológicas em cérebro de uma paciente *post mortem*. É uma doença neurodegenerativa, caracterizada pela perda progressiva de memória e diminuição de funções cognitivas em um processo associado com a perda de neurônios, com consequentes respostas inflamatórias e anormalidades mitocondriais (Reddy e Beal, 2008). A DA resulta da interrupção dos circuitos corticais associadas a morte neuronal e perda sináptica. Nesta doença, há uma vulnerabilidade seletiva, em que a degeneração de neurônios gera demência (Donohue et al., 2014; Koch et al., 2014; Spires-Jones e Hyman, 2014).

Dentre as principais características fisiopatológicas da DA, encontram-se perda sináptica, aumento de placas senis constituídas de peptídeo A β extracelular (formado a partir do processo amiloidogênico da proteína precursora amiloide) e aumento de emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos por agregados da proteína Tau hiperfosforilada, uma proteína estabilizadora dos microtúbulos (Serrano-Pozo et al., 2011; Krstic e Knuesel, 2013, Villemagne et al., 2018). Estas mudanças são acompanhadas por astrogliose e ativação de células da microglia (Heneka et al., 2010; Verkhratsky et al., 2010). Acredita-se que as placas A β e os emaranhados neurofibrilares sejam as principais características desta doença, acompanhadas por uma marcante atrofia e perda de neurônios cerebrais (Nimrich e Ebert, 2009). Atualmente, entretanto, novas hipóteses como neuroinflamação e estresse oxidativo estão sendo propostas como causadoras de DA, considerando que muitas alterações moleculares ocorrem antes do aparecimento das placas de A β e emaranhados no cérebro (Nazem et al., 2015).

A proteína precursora amiloide (APP) é uma proteína transmembrana tipo I que desempenha papéis importantes no crescimento dos neuritos, tráfego de proteínas neuronais, transdução de sinal e metabolismo do cálcio (Zheng e Koo, 2006). Esta proteína pode ser clivada por enzimas chamadas secretases do tipo α , β e γ . A clivagem da APP pela enzima β -secretase (clivagem extracelular) e γ -secretase (clivagem intracelular) dá origem primeiramente ao fragmento extracelular da APP

(APPs β) e, na sequência, ao peptídeo A β e o domínio intracelular da APP. Porém, a clivagem combinada da APP pela α -secretase (clivagem extracelular em sítio distinto daquele da β -secretase, dentro da sequência de aminoácidos que formam o peptídeo A β) e γ -secretase dá origem ao fragmento APPs α , prevenindo a formação do peptídeo A β . Adicionalmente, esta via não amiloidogênica dá origem ao peptídeo P3 e ao domínio intracelular da APP (Wilquet e De Strooper, 2004; Danysz e Parsons, 2012; Di Carlo et al., 2012).

Dentre os peptídeos formados pela via amiloidogênica, encontram-se principalmente os peptídeos A β 1-40 e A β 1-42, embora sejam produzidos outros peptídeos, como os peptídeos A β 1-37 e A β 1-43. Entretanto, estes últimos se encontram em menor quantidade (Claeyssen et al., 2012). O peptídeo A β 1-42 apresenta uma tendência maior a se agregar do que o A β 1-40 e tem-se atribuído a ele a forma patogênica principal presente na DA. O acúmulo destes peptídeos A β s induz neurotoxicidade e acredita-se que este seja um fator fisiopatológico crucial para o desenvolvimento da DA (Danysz e Parsons, 2012).

Em condições fisiológicas, a fosforilação da proteína Tau contribui para a manutenção do citoesqueleto dos neurônios. Esta proteína encontra-se principalmente nos axônios, mas também pode ser encontrada nos neuritos. O balanço entre a Tau fosforilada e não fosforilada regula a estabilidade dos microtúbulos no citoesqueleto, agindo como um sistema de transporte, visto que mantêm o fluxo axoplasmático (Goedert, 1993; Goedert et al., 2006; Spillantini e Goedert, 2013). Quando há um desequilíbrio entre as atividades das quinases e fosfatase da tau, ocorre uma hiperfosforilação desta proteína. Isso induz redução da afinidade da proteína Tau com as proteínas que formam o citoesqueleto dos microtúbulos, aumento de proteases ativadas por cálcio e aumento da sua degradação via ubiquina-proteossomo (Iqbal et al., 2009; Medeiros et al., 2010). Além disso, induz a agregação intracelular dos emaranhados neurofibrilares, característica importante da patologia da DA (Danysz e Parsons, 2012).

Tanto os depósitos extracelulares de A β quanto os emaranhados neurofibrilares intracelulares são encontrados em neurônios e células da glia de regiões cerebrais responsáveis pela memória e cognição. Dentre estas regiões com extensa neurodegeneração, encontram-se o sistema límbico (Arnold et al., 1991; Klucken et

al., 2003), regiões neocorticais (Terry et al., 1981) e o prosencéfalo basal (Teipel et al., 2005). Este processo neurodegenerativo é caracterizado pela destruição precoce das sinapses (Masliah e Terry, 1994; Masliah, 2000; Crews e Masliah, 2010), com degeneração retrógrada dos axônios e eventual atrofia da árvore dendrítica (Coleman e Perry 2002; Higuchi et al., 2002; Grutzendler et al., 2007) e corpo celular (Hyman et al., 1986; Lippa et al., 1992). Os depósitos de A β e emaranhados neurofibrilares são fatores precipitantes de múltiplas vias neurotóxicas, como excitotoxicidade glutamatérgica, estresse oxidativo, depleção energética, inflamação, apoptose e disfunção das neurotrofinas associadas ao intenso prejuízo cognitivo observado em pacientes com DA (Hock, et al., 2000; Dong et al., 2009; Lau e Tymianski, 2010; Mehta et al., 2013; Octave et al., 2013).

A etiologia da doença ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que múltiplos fatores ambientais e genéticos estão envolvidos, como idade, sexo, histórico familiar, educação, depressão, hipertensão, diabetes, colesterol alto, baixa atividade física e cognitiva, hábitos de vida e medicamentos (Schipper, 2011). A terapia farmacológica atualmente aprovada para a DA é apenas paliativa. Promove melhora cognitiva temporária e modesta, sem alterar o curso da doença ou o resultado final desta. As principais classes de fármacos utilizados na DA são inibidores da atividade da enzima acetilcolinesterase (IACHÉ) e antagonistas de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Bond et al., 2012).

1.2 ALZHEIMER E INFLAMAÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa contra as múltiplas ameaças, incluindo as infecções e lesões. O processo inflamatório é complexo, e envolve células especializadas que são mobilizados para neutralizar e restaurar a fisiologia normal do corpo. No cérebro, as células gliais, em especial os astrócitos e microglia são submetidos a ativação sob os mediadores pró-inflamatórios. A inflamação desempenha um papel crítico na patogênese da DA e doenças metabólicas, incluindo a diabetes mellitus tipo 2 (DMII) (Coleman e Perry, 2002, Ferreira, 2014).

A inflamação é observada nos cérebros de indivíduos com DA, porém o que sustenta a inflamação na DA não é clara. Enquanto uma resposta imediata a um patógeno invasor é benéfica, uma reação inflamatória sustentada irá provocar danos

nos tecidos e declínio funcional (Wilkin et al., 2004). O sistema nervoso central (SNC) já foi considerado imuno-privilegiado por causa da presença da barreira hematoencefálica (BHE). O acesso de células imunes ao SNC é restrito e rigidamente controlado, porém é capaz de iniciar respostas dinâmicas imunes e inflamatórias a uma variedade de insultos, como infecções, trauma, acidente vascular cerebral, toxinas e outros estímulos. Esta resposta neuroinflamatória aguda inclui a ativação de células imunes residentes (microglia) (Popovich et al., 2008; Ferreira et al., 2014). A microglia, composta por macrófagos, influencia na sobrevivência neuronal, na plasticidade sináptica e na função cognitiva. Influências ambientais, como expressão antigênica e injúria celular, determinam fenótipos reativos por meio de expressão proteica e alterações morfológicas (Medzhitov et al., 2000; Streit et al., 2004).

A ativação microglial crônica é um componente importante das doenças neurodegenerativas e este componente provavelmente contribui para a disfunção neuronal, lesões e perda de memória (Crutcher et al., 2009; Ferreira et al., 2014). A liberação sustentada de mediadores inflamatórios perpetua um ciclo vicioso inflamatório, ativando mais microglia, promovendo sua proliferação, e liberação de mais mediadores (Ferreira et al., 2014). A cronicidade deste processo associada à natureza sustentada da inflamação compromete a BHE, que aumenta a infiltração de macrófagos da periferia ao parênquima cerebral e perpetua a inflamação (Rivest et al., 2009). Durante o envelhecimento, um dos fatores de risco para a DA, se observa aumento de fatores neuroinflamatórios que se postula estarem associados a doenças cerebrais, este fenômeno está sendo chamado de inflamação do envelhecimento ou do inglês *"inflammaging"* (Yin et al., 2016)

Devido a este processo, a microglia ativada pode liberar citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas IL-1 β e IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o interferon-gama (IFN- γ) e a proteína inflamatória de macrófagos (PIM), que regulam a sinalização clássica da cascata inflamatória do ácido araquidônico (AA) por meio de fatores de transcrição NF- κ B e ativação da proteína-2 (AP-2) como mostrado na figura 1. A indução destas vias de inflamação está associada com a hiperfosforilação da Tau (Nazem et al., 2015). A microglia tem a capacidade de fagocitar e degradar as placas de A β atuando como um fator protetor cerebral, entretanto durante o envelhecimento ocorre uma diminuição desta capacidade, e o

aumento da produção destes fatores inflamatórios durante o envelhecimento transforma a ativação microglial em pró-inflamatória, o que a associa a neurodegeneração. Em modelos transgênicos de DA a ativação crônica da microglia é sempre um componente fundamental para o desenvolvimento da doença (Tang e Le, 2016).

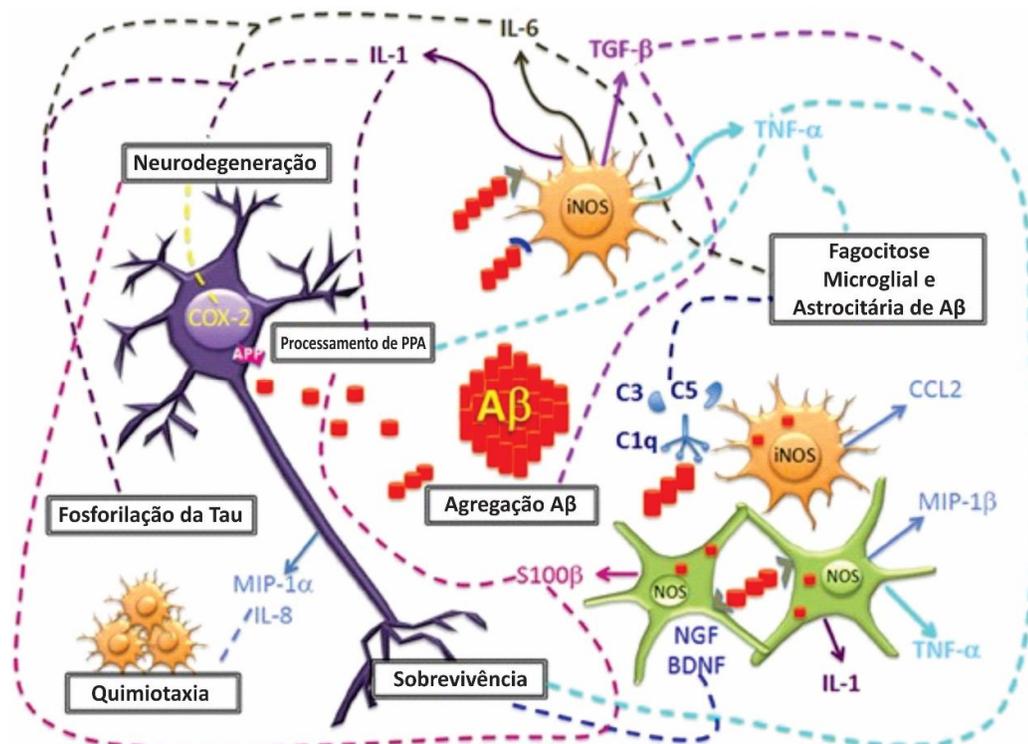


Figura 1: Sistema de dano neural e ativação microglial. O dano neuronal e a deposição de A β desencadeiam a ativação microglial e de astrócitos, e a geração de mediadores moleculares de inflamação. Em consequência promovem uma maior expressão e alteração do processamento de APP, deposição de A β , fosforilação de Tau, neurodegeneração e estresse oxidativo. Em contraste, foi proposto que as células gliais possam mediar a sobrevivência neuronal, mas a progressão da doença resulta na falha do reparo dos neurônios. Fonte: Adaptado de Meraz-Ríos et al., 2013

A IL-1 está aumentada em pacientes com DA e em modelo transgênico de hiperexpressão dessa interleucina, apresentam fatores semelhantes a DA apesar de não ser considerado um modelo da doença (Tang e Le, 2016). Além disso a diminuição da ação do fator de crescimento neural (NGF) por anticorpos induz neuroinflamação e é descrito como um modelo de DA. Ainda modelos nocaute para TGF- β levam a neuroinflamação e neurodegeneração, mostrando que a DA tem sua

etiologia ainda não elucidada e pode envolver uma série de fatores, além dos marcadores já classicamente descritos (Nazem et al., 2015).

1.3 ALZHEIMER, FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO

A neuroenergética é a capacidade do cérebro de produzir e usar energia necessária para manter sua funcionalidade. Recentemente, esse campo da neurociência vem ganhando cada vez maior espaço devido às novas descobertas em relação ao uso de substratos energéticos pelas células neurais e a sua capacidade de influenciar tanto processos fisiológicos como patológicos. A glicose é considerada o principal substrato energético utilizado pelas células cerebrais, contudo tem sido demonstrado que outros nutrientes como aminoácidos, corpos cetônicos e lactato também são utilizados e exercem grande importância na manutenção do equilíbrio energético cerebral (Pellerin, 2008).

Os neurônios são altamente dependentes de adenosina trifosfato mitocondrial para a manutenção de suas funções fisiológicas, tais como: manutenção dos gradientes iônicos na membrana celular, essencial para o potencial de membrana, mobilização de vesículas sinápticas dos seus reservatórios, plasticidade cerebral entre outros (Muller et al., 2013). Além da função energética a mitocôndria neuronal tem uma função fundamental na regulação dos níveis de Ca^{2+} atuando como um tampão que sequestra o Ca^{2+} liberado no citosol, o que regula possíveis efeitos neurotóxicos desse íon, além de também liberar Ca^{2+} para prolongar o sinal intracelular, mostrando que esta organela tem uma função neurotransmissora. Danos às membranas e proteínas mitocôndriais podem ocasionar déficit na produção de ATP e no processo de fuselagem de Ca^{2+} , ocasionando uma disfunção em toda a célula (Cai e Tammineni, 2017). Portanto a atividade mitocondrial acoplada à produção de ATP e a formação do potencial de membrana mitocondrial são essenciais para a manutenção da homeostase neuronal (Fulo et al., 2003; Mattson et al. 2008).

O metabolismo da glicose é essencial para a função energética cerebral seja na via anaeróbia, como principalmente na via aeróbia mitocondrial. O hipometabolismo da glicose é observado em pacientes com DA e associado a disfunção da cognição, inclusive sendo utilizado como um método de diagnóstico. O

cérebro utiliza uma grande parte do O_2 consumido, em torno de 20%, e, portanto, tem um grande potencial de gerar estresse oxidativo, que atualmente é considerado um fator desencadeante da DA, gerando oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, glico-oxidação proteica e acúmulo de $A\beta$ (Du et al., 2018). Tendo isso em vista, uma disfunção mitocondrial, leva ao estresse oxidativo que pode acarretar em diferentes transtornos no SNC (De La Monte e Wands, 2005; De Martins et al., 2005; De La Monte et al., 2009). A ativação da microglia na neuroinflamação e neurodegeneração induz alterações mitocôndriais e aumento da produção de ERO, que já foi associado ao desenvolvimento de DA (Song e Suk, 2017).

Pacientes com DA apresentam um aumento na utilização de oxigênio, sugerindo que uma disfunção na CTE possa estar envolvida na etiologia da doença (Cai e Tammineni, 2017). A hipótese da cascata mitocondrial na DA esporádica está associada a uma disfunção mitocondrial devido ao aumento do estresse oxidativo e aumento na deposição de placas $A\beta$. Ainda alterações no potencial de membrana mitocondrial diminuem a funcionalidade da mitocôndria e aumenta a geração de ERO (Tönnies e Trushina, 2017). A atividade reduzida dos complexos I e IV também é observada em pacientes com DA (Swerdlow, 2016).

O estresse oxidativo é uma condição biológica decorrente do desequilíbrio entre as atividades oxidantes e antioxidantes no corpo, conduzindo à produção excessiva de ERO, radicais livres e peróxidos (Hollander et al., 2000). O tecido cerebral é mais suscetível ao estresse oxidativo, devido a sua maior taxa de consumo de oxigênio, alto teor de ácidos graxos, menor capacidade regenerativa e baixas quantidades de antioxidantes. Os maiores sítios de geração de ERO estão no complexo I e III da cadeia de transporte de elétrons e a indução com succinato aumenta a produção de H_2O_2 (Muller et al., 2011; Muller et al., 2013), entretanto não se sabe se a neuroinflamação pode afetar esse mecanismo.

Assim, os radicais livres parecem desempenhar um papel fundamental no processo de envelhecimento cerebral, causado pela produção excessiva de ERO no cérebro, que tem sido considerado como a causa subjacente para a patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, e este está implicado na DA e torna-se uma característica proeminente e precoce da patologia (Zhou et al., 2012). O mau funcionamento mitocondrial exacerba o estresse oxidativo, e conseqüentemente os níveis de lipídeos, proteínas, ácido nucleicos e de oxidação, que aumentam nos

neurônios vulneráveis à DA (Correia et al., 2011). Novos tratamentos para a DA devem focar na melhora do funcionamento mitocondrial considerando ser esta organela “um local chave” para etiologia da doença.

1.4 MODELOS DE INDUÇÃO DE DEMÊNCIA

1.4.1 Modelo animal de demência por estreptozotocina (STZ)

A insulina apresenta funções fisiológicas e fisiopatológicas no SNC, causa saciedade, controle de peso, melhora na função cognitiva, aprendizagem e memória (Banks et al., 2012). Distúrbios associados à deficiência da liberação desse hormônio, ou até mesmo na disfunção do seu receptor, como diabetes mellitus (DM), demonstram contribuir, ou em alguns casos, possuir um papel principal no desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, como por exemplo a DA (Ghasemi et al., 2013). Estas duas patologias partilham vários aspectos fisiopatológicos, tais como resistência à insulina, agregação da proteína amiloide, processos inflamatórios e alterações cognitivas, sugerindo a existência de um processo patológico em comum ou relacionado (Blazquez et al., 2014). A DA está sendo considerada uma doença com características neuroendócrina associadas a resistência cerebral à insulina e denominada por alguns como “diabetes tipo 3” (Kroner, 2009) como mostrado na figura 2.

O modelo de resistência cerebral à insulina via administração intracerebroventricular (ICV) de STZ replica alguns achados bioquímicos em pacientes e em modelos animais de DA. A administração de STZ via ICV em ratos demonstrou induzir uma resistência à sinalização da insulina em regiões cerebrais associadas à aprendizagem e a memória que leva a disfunção cognitiva, prejuízo no metabolismo energético, aumento do estresse oxidativo, hiperfosforilação da proteína Tau e aumento de A β (Correia et al., 2011). Além disso, a administração de STZ via ICV causa uma neuroinflamação por aumentar a expressão de NF- κ B, citocinas pró-inflamatórias, BDNF e células gliais derivadas de fator neurotrófico (Sharma e Gupta, 2001; Grunblatt et al., 2006).

O uso de STZ via ICV em baixas doses, 1 e 3mg/kg, não causa nenhuma alteração na glicemia, mas causa hipometabolismo da glicose cerebral com déficit

na produção de ATP e causa déficit cognitivo a partir de 10 dias até 3 meses após de sua administração (Salkovic-Petrisic et al., 2006; Salkovic-Petrisic e Hoyer, 2007; Ravelli et al., 2017)

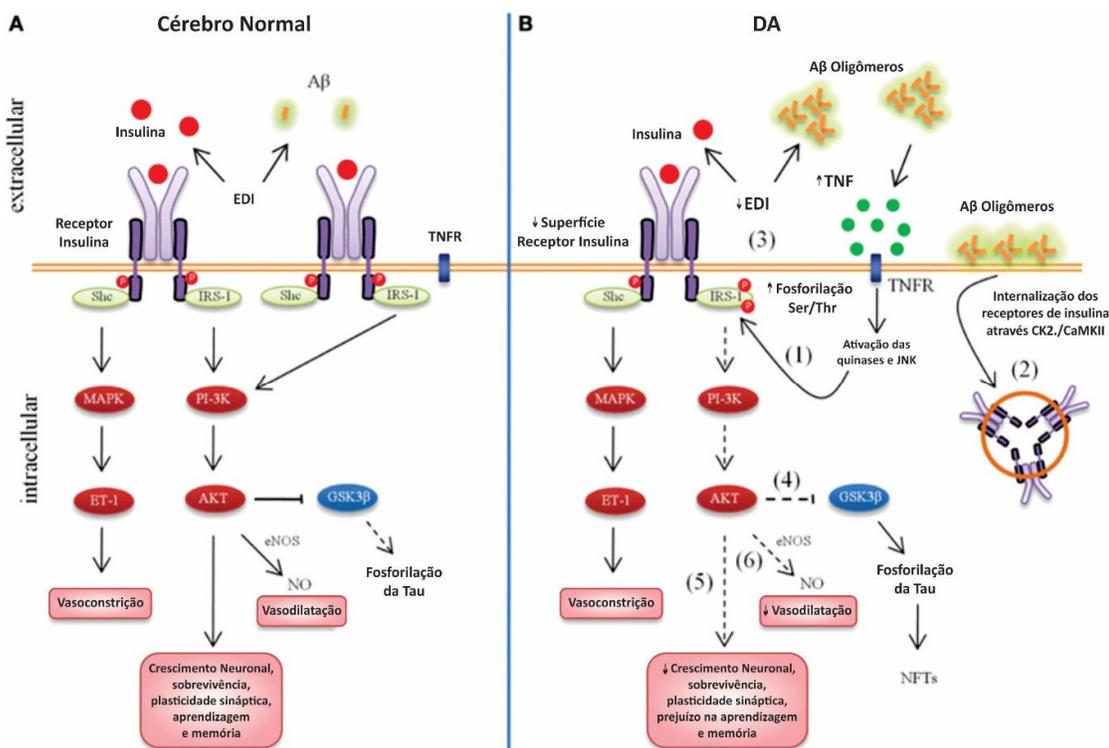


Figura 2: Sinalização de insulina do cérebro acometido pela doença de Alzheimer (DA). Esboço esquemático da sinalização de insulina neuronal no cérebro normal (A) onde a sinalização da insulina ocorre normalmente, forforilando GSK3β e inibindo sua atividade, e no cérebro com DA (B) onde as placas Aβ, sinalizam o receptor de TNF-α, ativando a via da JUNK, sinalizando a subunidade do RI em serina, inibindo a progressão da cascata de sinalização, em consequência não ocorre a inativação da GSK3β, deixando a mesma forforilar a proteína Tau, gerando um desequilíbrio, que acarretara em produção dos emaranhados neurofibrilares, levando a um dano cerebral como consequência. Fonte: Adaptado de Kroner, 2009.

1.4.2 Modelo animal de demência por Ácido Ocadáico (AO)

O AO é uma toxina produzida por microalgas marinhas, que é um importante inibidor da enzima Ser/Thr fosfatase, e é um inibidor específico da síntese de proteínas por hiperfosforilação do fator de alongamento EF2. Além disso, esta toxina também é responsável por muitas condições clínicas, tais como diarreia grave e

dano de memória em humanos após o consumo de crustáceos contaminados, levando a um quadro de envenenamento (Zhao et al., 2004).

Estudos mostraram que o AO provoca a morte das células do cérebro *in vitro* e *in vivo*, através da inibição da serina/treonina fosfatase PP1/2A. Este mecanismo pode ser uma consequência da rápida mudança da relação entre a fosforilação e a defosforilação de proteínas cerebrais (Zhao et al., 2004). No cérebro a proteína Tau desempenha um papel importante na estabilização de microtúbulos do citoesqueleto do neurônio, em que o corpo tem um mecanismo para proteger esta proteína, tais como a proteína fosfatase PP1 e PP2A, que pode defosforilar a Tau *in vitro* (Kamat et al., 2014).

Um dos passos na patogênese da DA é a hiperfosforilação da proteína Tau, a atividade de PP2A parece ser reduzida no cérebro. Esta regulação baixa pode estar relacionada à diminuição do processo de defosforilação da Tau, causando danos na memória, induzida pela administração de AO. Foi observado em outros estudos, que ocorreu alterações significativas neurológicas, tais como a neurodegeneração do hipocampo, a hiperfosforilação da proteína Tau e a formação de placas A β (Ahmed et al., 2014). O aumento na desmetilação mediada pela PP2A, gera uma produção de A β , podendo contribuir para reduzir a atividade da PP2A, resultando em defosforilação, danificando a proteína Tau mantendo-a hiperfosforilada (Kamat et al., 2014).

A hiperfosforilação de Tau devido à inibição da fosfatase induz o estresse neuronal e a neurodegeneração subsequente. Isto é, principalmente devido à perda de células piramidais e às células apoptóticas no hipocampo, que compreende a região do cérebro conhecida para as funções de aprendizagem e memória (Kamat et al., 2014). Diversos estudos mostraram essa relação do AO com a capacidade de inibir a proteína PP2A e induzir a hiperfosforilação da proteína Tau, levando à morte celular (Figura 3). O AO também induziu a fosforilação em serina da GSK3 β e outros substratos, como ocorre na patogênese da DA (Ahmed et al., 2014). Também na patogênese da DA há uma redução uniforme nos marcadores pré-sinápticos da atividade colinérgica, tais como Acetilcolinesterase (AChE) e a Acetil colina transferase (ChAT). Estudos mostraram que, após a administração de AO em hipocampo de ratos, houve diminuição dos níveis de acetilcolina, além de acarretar

na hiperfosforilação de Tau, acompanhado de déficit na memória espacial (Iqbal et al., 2009). Em outro estudo, cujo objetivo foi avaliar a função cognitiva e as alterações bioquímicas do cérebro em ratos submetidos ao AO 100ug ICV, ocorreu déficit cognitivo na memória espacial, alterações gliais, aumento do estresse oxidativo, aumento na carbonilação de proteínas e redução do teor de glutathiona (glutathiona reduzida) 12 dias após a indução da doença (Chen et al., 2011).

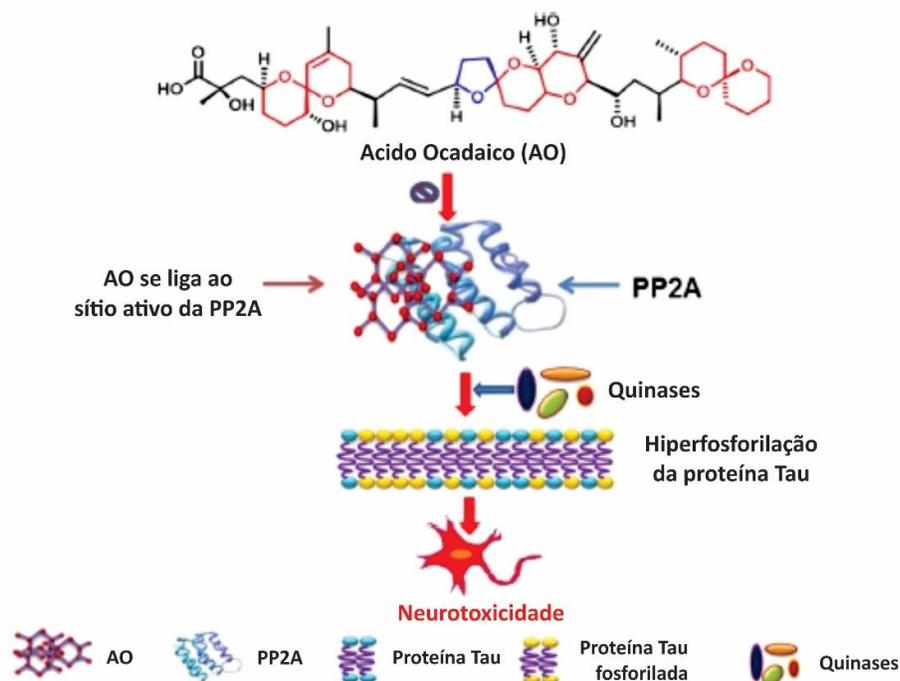


Figura 3: Estrutura química e mecanismo do AO induzindo neurotoxicidade. Ácido ocadaico (AO) inibe seletivamente a Serina / treonina (Ser / Thr) fosfatase 2A e assim induz hiperfosforilação de Tau por ativação de quinases, levando a uma condição de Neurotoxicidade causando a morte dos neurônios. Fonte: Adaptado de Kamat et al., 2014.

1.5 TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO (NPAu)

A nanobiotecnologia é um ramo da nanotecnologia que funde a ciência dos materiais com as ciências biológicas, gerando conhecimento e novos produtos. Durante as últimas décadas, as nanopartículas inorgânicas cujas estruturas exibem funcionalidade e propriedades biológicas devido ao seu tamanho, tem despertado muito interesse de diferentes grupos e áreas de pesquisa na área da saúde (Bhattacharya e Mukherjee, 2008). Partículas entre 1 e 100 nm de diâmetro podem

atravessar tecidos, membranas celulares e organelas (Fadeel e Garcia-Bennett, 2010). Assim, nanopartículas de metal têm sido estudadas para determinar seus usos na bioimagem e biomedicina (Jain et al., 2007; Sperling et al., 2008). Dentre elas, destacam-se as NPAu, que têm aplicações no tratamento do câncer, bem como entrega de drogas (Tedesco et al., 2010). Dohnert et al. (2012) e Victor et al. (2012), recentemente demonstraram a ação antiinflamatória das NPAu no tratamento de tendinites e dano em modelos animais.

A nanotecnologia tem sido explorada extensivamente como uma área de pesquisa em potencial para o desenvolvimento de modalidades terapêuticas mais recentes para o tratamento de problemas neurológicos. Com o envelhecimento da população, a entrega de drogas para o cérebro para o tratamento de doenças relacionadas ao envelhecimento continua a ser uma tarefa desafiadora. Alguns estudos têm mostrado que a NPAu pode circular pelo sangue e pode chegar no cérebro *in vivo* com alterações não significativas na integridade da barreira hematoencefálica ou permeabilidade (Burmester, 2004; Barathmanikanth et al., 2010). Embora o mecanismo exato de transporte não seja conhecido, a ausência de toxicidade para a certificação tanto *in situ* quanto em *in vivo*, sugere que as NPAu podem ser transportadas através da barreira por endocitose e/ou transcitose ou por difusão passiva, na ausência de abertura da barreira. Elas podem ser concebidas para imitar as lipoproteínas de baixa densidade e interagir com os seus receptores, desencadeando assim a absorção pelas células endoteliais do cérebro (Barathmanikanth et al., 2010).

Mas essa ausência de toxicidade é dependente de diversos fatores, tais como tamanho, concentração, método de injeção, metabolismo, excreção e resposta imune (Li et al., 2018). O uso de NPAu de tamanho 10 a 7nm em suspensão de neutrófilos humanos causou apoptose dessas células após 24hs (Noel et al., 2016). O tamanho da NPAu parece ser fundamental para causar toxicidade, tamanhos menores de 5nm estão associados com maiores danos (Siddiqi et al., 2012). Já as NPAu esférica entre 20-30nm atravessam melhor as membranas celulares e conseguem chegar a diferentes tecidos (Li et al., 2018). O uso *in vivo* de NPAu de 21nm revestida com citrato não causou toxicidade em tecidos periféricos como rim, fígado, coração e enzimas sanguíneas (Chen et al., 2013).

O mecanismo e local de ação das NPAu não estão bem elucidados. Contudo, alguns dados mostram a mitocôndria como um possível alvo. Como efeito, a NPAu modulam a interação entre grupos funcionais tais como tióis (-SH) e aminas (-NH₂). (Huang et al., 2005a). Estudos mostraram que as NPAu são redutoras, auxiliando no controle de produção de radicais livres pela CTE (Hughes et al., 2004; Muller et al., 2017). Outros estudos apresentaram resultados promissores no tratamento de 48h, aumentando a atividade do complexo I e II (Muller et al., 2017). No entanto, o uso diário de NPAu diminuiu a atividade do complexo II (Laird et al. 2005; Muller et al., 2017).

A utilização das nanopartículas no tratamento de diversas doenças e outras desordens relativas surge devido as evidências do efeito antioxidante do ouro no tratamento tradicional das doenças. As nanopartículas biometálicas formadas por ouro e platina são eficazes contra ERO, incluindo H₂O₂ e o radical ânion superóxido (O₂^{•-}) (Kajita et al., 2007), agindo também sobre a GSH, que é um redutor livre do grupo funcional tiol, responsável pela desintoxicação dos peróxidos, tais como o peróxido de hidrogênio, atuando como um importante antioxidante das células. No processo de desintoxicação, a GSH na forma reduzida fica oxidada. Demais estudos confirmam o papel efetivo da NPAu como um agente antioxidante, por inibir a formação de ERO, agindo como sequestrador de radicais livres, melhorando assim a ação de enzimas antioxidantes (Tesai, 2007; BarathManiKanth et al., 2010; Sul et al., 2010; Nie et al., 2012).

Os efeitos anti-inflamatórios *in vivo* envolvem a supressão da ativação de macrófagos e microglia em danos cerebrais (Larsen et al., 2008). Foi mostrado *in vitro*, que os mecanismos moleculares da ação do ouro implicam na redução dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como as interleucinas, TNF- α e eicosanoides, e também na inativação de enzimas fagolisossomais, quinase indutora do I-kappa B (I κ B-kinase), e atividade do NF- κ B (Yang et al., 1995; Chircorian e Barrios, 2004; Navarro et al., 2006; Han et al., 2008).

Pedersen et al. (2009), mostram em seus resultados que as NPAu reduzem TNF- α em regiões hipocampais, modulam o estresse oxidativo em cérebro de ratos, reduzem liberação de citocromo C mitocondrial no citoplasma de animais tratados, além de diminuir os níveis de caspase-3 ativadas. Tsai (2007), reforça essa tese mostrando que as NPAu têm efeito anti-inflamatório agindo em citocinas pró-

inflamatórias com diminuição nos níveis de TNF- α e IL-1 β , bem como redução dos escores histológicos, densidade de micro capilares, infiltração de macrófagos em um modelo experimental de artrite. As NPAu são utilizadas para o tratamento de várias doenças inflamatórias e outras desordens relativas devido as suas propriedades biológicas, ópticas e químicas (Bhattacharya e Mukherjee, 2008). Com isso, a proposta do uso de NPAu para reduzir o efeito inflamatório e oxidante da resistência cerebral à insulina e taupatia mostra-se promissor e bem fundamentado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos terapêuticos da administração de nanopartículas de ouro em dois modelos de demência tipo doença de Alzheimer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o melhor intervalo de tratamento, considerando a segurança do uso de NPAu em fígado e soro de ratos.

Avaliar a função cognitiva, através de testes comportamentais, nos animais submetidos aos modelos de demência.

Avaliar a função mitocondrial nos animais submetidos aos modelos de demência.

Dosar os marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β) e antiinflamatório (IL-4) em córtex e hipocampo, nos animais submetidos aos modelos de demência de taupatia.

Dosar os fatores neurotróficos (BDNF e NGF) em córtex e hipocampo, nos animais submetidos aos modelos de demência de taupatia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos jovens pesando em média 250g a 300g de 60 dias. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense e mantidos em gaiolas em ciclo claro/escuro de 12h, com alimentação e água *ad libitum*, com temperatura entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$.

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). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob o protocolo de aprovação nº 088/2015-1 e respeitou estritamente os princípios éticos na experimentação animal.

Após os experimentos, os animais mortos foram acondicionados em saco branco leitoso e encaminhados para freezer (conservação) na própria universidade. Após isso, foram coletados e transportados por uma empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos atendem o disposto na RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). O desconforto dos animais foi minimizado na medida em que somente pessoal devidamente treinado realizou os procedimentos.

3.2 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E USO DAS NPAu

As NPAu de tamanhos médios de 20nm foram sintetizadas pelo método Turkevitch (1951), com pequenas modificações (Cardoso et al., 2014). O material foi cedido gentilmente pelo professor Dr. Marcos Marques da Silva Paula, do Laboratório de Processos Inflamatórios e Metabólicos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL – Tubarão/SC.

3.3 ADMINISTRAÇÃO DE NPAu E GRUPOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Protocolo para padronização do melhor intervalo de administração da NPAu

Os animais receberam por via intraperitoneal solução salina ou NPAu na dose de 2,5mg/kg, de tamanho de 20nm, por um período de 21 dias, com intervalos de 24hs e 48hs, divididos em grupos distintos. Após o tratamento os animais foram eutanasiados (decapitação) e cérebro total, fígado e sangue foram coletados para análise de histologia por foto micrografias e análise dos níveis hepáticos e séricos de colesterol, triglicerídeos e transaminases. Os animais foram randomizados em 3 grupos (n=10 animais por grupo): Grupo 1: administrado salina a cada 24hs. Grupo 2: administrado NPAu a cada 24hs. Grupo 3: administrado NPAu a cada 48hs.

3.3.2 Protocolo para os modelos de demência

Os animais receberam por via intraperitoneal solução salina ou NPAu na dose de 2,5mg/kg, de tamanho de 20nm, por um período de 21 dias, com intervalo de 48hs. Após o tratamento, os animais foram submetidos a testes comportamentais, eutanasiados por decapitação e córtex e hipocampo retirados para análises bioquímicas. Os animais foram randomizados em 4 grupos (n=8-10 animais por grupo): Grupo 1: Sham+Salina, Grupo 2: Sham+NPAu, Grupo 3: STZ ou AO + Salina, Grupo 4: STZ ou AO + NPAu, administrados a cada 48hs.

3.4 MODELO ANIMAL TIPO-DA POR ESTREPTOZOTOCINA

Para induzir características da patogênese tipo-DA em animais, foi utilizado a STZ na dose de 3mg/kg total, injetados ICV bilateralmente. Ratos Wistar machos adultos jovens (60 dias) foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). Foi realizada cirurgia estereotáxica para injeção nas coordenadas 1.0 mm posterior ao bregma, 2.0 mm lateral ao bregma e 3.0 mm ventral, de acordo com o atlas do cérebro de Painhos e Watson (1982). Neste momento foi injetado 2 µL de STZ 1,5mg/kg cada lado, sendo 1uL/minuto. Ratos Sham operados receberam os mesmos procedimentos cirúrgicos, porém foram injetados com volume idêntico de solução salina.

3.5 MODELO ANIMAL TIPO-DA POR ACIDO OCADAICO

Para induzir características da patogênese tipo-DA em animais, foi utilizado o AO na concentração de 100ug por animal, via ICV unilateralmente. Ratos Wistar machos adultos jovens (60 dias) foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Foi realizada cirurgia estereotáxica para injeção nas coordenadas 1.0 mm posterior ao bregma, 2 mm lateral ao bregma e 3.0 mm ventral, de acordo com o atlas do cérebro de Painhos e Watson (1982). Foi administrado 2ul no ventrículo direito de solução, sendo 1ul/minuto. Ratos controles operados receberam os mesmos procedimentos cirúrgicos, porém foram injetados com volume idêntico de solução salina (Soro fisiológico 0,9%).

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.6.1 Barnes Maze

Após 21 dias de tratamento com NPAu foi avaliada a performance cognitiva. Para avaliar a memória espacial utilizou-se o protocolo de labirinto de Barnes (Figura 4) adaptado de Yang et al. (2013). O aparelho é um disco de 1,0 m de diâmetro levantado 75 cm do chão contendo 20 furos de escape possível, um dos quais leva a uma caixa de escape escuro. A luz acesa foi usada para aumentar a motivação para a fuga. Os animais foram treinados para localizar a caixa escura, permitindo-lhes explorar o labirinto, durante 60 segundos. Se os animais não encontrassem a caixa de fuga dentro do prazo eram, suavemente, encorajados a entrar nela. As experimentações terminavam quando os animais encontravam a caixa da fuga ou após 60 segundos. Os animais foram treinados, durante 5 dias, para aprender a localização da caixa de escape do labirinto, utilizando sinais espaciais na sala de testes. Após os treinos, no 6º dia, os animais foram submetidos ao teste de retenção de memória, a caixa de escape foi retirada do equipamento. Foi avaliado quanto tempo os animais exploravam o quadrante alvo, onde ficava a caixa escape, num tempo total de 60 segundos.

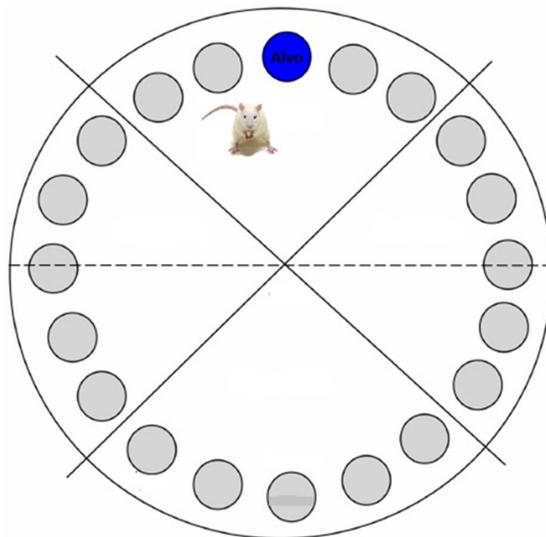


Figura 4: Aparelho para realização do teste Barnes Maze. Plataforma circular com 20 furos, onde um deles tem uma caixa de escape. Imagem mostra suas subdivisões para analisar o tempo de exploração do animal no quadrante alvo. Fonte: Adaptado de <https://www.researchgate.net>

3.6.2 Water Maze

Para avaliar a memória espacial foi utilizado o labirinto aquático de Morris, que consiste em uma piscina circular de cor preta (200 cm de diâmetro, 100 cm altura), preenchida com água a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 5). Os ratos receberam sessões diárias de treino, constituindo de 4 treinos por dia, durante 3 dias consecutivos para encontrar a plataforma no centro do quadrante 1 do tanque submersa a 1 cm do nível da água. A plataforma permaneceu no mesmo lugar durante toda a fase de aquisição. Após ser colocado na água, foi permitido a cada animal nadar livremente na piscina para procurar a plataforma durante 60 segundos. Uma vez localizada a plataforma, foi permitido ao rato permanecer sobre ela por 20 segundos. Se o animal não encontrou a plataforma durante 60 segundos, ele foi guiado pelo experimentador e permaneceu sobre a plataforma por 20 segundos. O intervalo entre cada treino foi de 15-20 minutos. Um dia após o último treino (4º dia), a plataforma foi removida, e cada rato submetido a um teste de 60 segundos onde foi mensurado o tempo que o animal ficou no quadrante alvo.

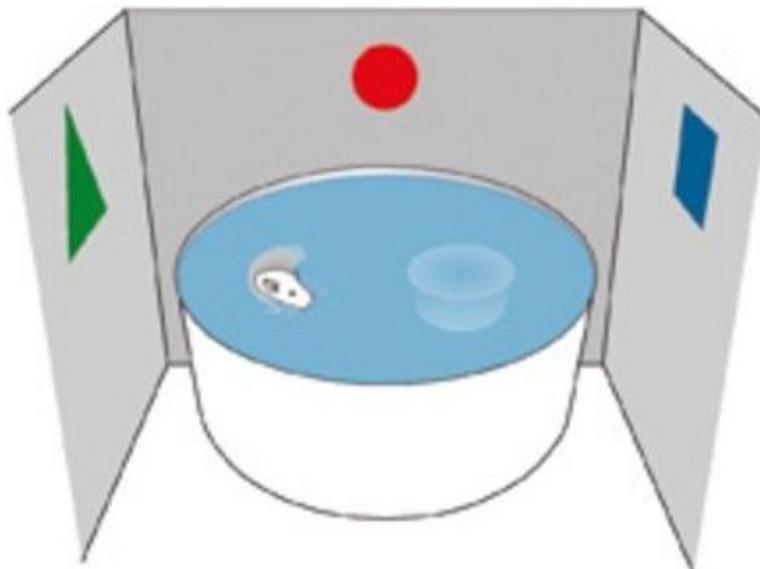


Figura 5: Aparelho para realização do teste Water Maze. Piscina circular, onde o animal nada até achar a plataforma escape. Imagem mostra o ambiente que o animal fica para a realização dos treinos e teste, e as paredes tem placas sinalizadoras para a orientação do animal. Fonte: Adaptado de <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article>

3.6.3 Reconhecimento de Objetos

Após 21 dias de tratamento os animais passaram pelo teste comportamental de reconhecimento de objetos que foi realizado no campo aberto que é uma caixa de 40 por 60 cm, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada preta assoalho dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas (Figura 6). No primeiro dia, antes de qualquer procedimento, considerado o dia da habituação, o animal foi colocado no canto superior esquerdo na caixa, e deixado por 5 minutos, sem nenhum objeto na caixa, para que se habitue ao ambiente. Após 24 horas, na sessão treino, o animal foi recolocado no campo aberto, com dois objetos exatamente iguais A1 e A2 paralelos e deixados por 5 minutos para que os animais explorem o ambiente livremente. O tempo de exploração de cada objeto foi cronometrado, para posterior análise através do índice de reconhecimento. Para testar a memória de longa duração o animal foi recolocado na caixa, 24 horas após a sessão treino, com dois objetos, um que ele já estava familiarizado, A1, e um objeto totalmente distinto, C1, de cor, forma e tamanho diferente, e o animal teve 5 minutos para explorar o novo ambiente (Izquierdo et al., 2006). Para a análise dos resultados foi usado o índice de reconhecimento que é calculado pela fórmula $TB1/$

(TA1 + TB1) onde TA é o tempo gasto para explorar um objeto familiar, que já é conhecido do animal, e TB é o tempo gasto para explorar o novo objeto.

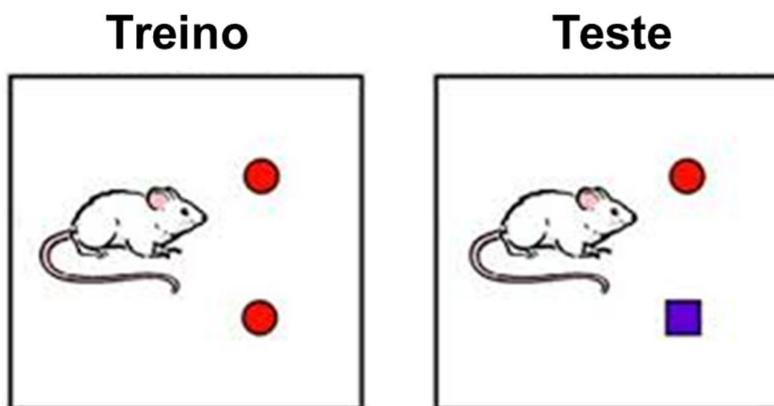


Figura 6: Aparelho para realização do teste de reconhecimento de objetos. Imagem ilustrativa para situar os animais numa caixa com objetos iguais no dia de treino e uma caixa com objetos diferentes no dia de teste. Fonte: Adaptado de <https://knowingneurons.com/novel-object-recog-test>

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas foram mensuradas de acordo com o método de Lowry et al. (1951), e albumina sérica bovina foi utilizada como padrão. Reagente de fenol, folin (reagente fosfo-metil bico-fosfotungstico) foi adicionado para se ligar à proteína. O reagente foi lentamente reduzido, mudando sua coloração do amarelo para o azul. A absorbância foi medida a 620 nm.

3.8 PRODUÇÃO DE H₂O₂

O cérebro total (modelo de STZ), córtex e hipocampo (modelo AO) foram dissecados e homogeneizados em tampão de isolamento (0,32 M sacarose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado 4.000 rpm (3min). O sobrenadante foi incubado em tampão de respiração (10 mM Tris HCl, pH 7,4, 0,32 M mannitol, 8 mM fosfato de sódio, 4 mM MgCl₂, 0,08 mM EDTA e 0,2 mg/mL de albumina bovina livre de ácidos graxos) com adição 10 mM AmplexRed para determinação específica de H₂O₂ por fluorescência e HRP 2U/mL analisados em leitor de microplaca Spectra Max M5) (Molecular Devices) em comprimento de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão. No modelo de STZ via ICV foram adicionados succinato 1mM e ADP 2 mM para avaliar a produção de H₂O₂ em

respostas a substratos energéticos. No modelo de AO foram adicionados succinato 1mM e oligomicina 0,2ug/mL (Muller et al., 2013). Neste protocolo devido ao uso de diferentes levas de animais a média dos resultados do grupo controle foi considerada 100% e os demais comparados a este valor.

3.9 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$)

O cérebro total (modelo de STZ), córtex e hipocampo (modelo AO) foram dissecados e homogeneizados em tampão de isolamento (0,32 M sacarose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado 4.000 rpm (3min). O Sobrenadante foi incubado em tampão de respiração (10 mM Tris HCl, pH 7,4, 0,32 M mannitol, 8 mM fosfato de sódio, 4 mM MgCl₂, 0.08 mM EDTA e 0.2 mg/mL de albumina bovina livre de ácidos graxos) com adição 3 mM a sonda catiônica safranina O para determinação do potencial de membrana mitocondrial por fluorescência (comprimento de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão, leitor de microplaca Spectra Max M5) (Molecular Devices). No modelo de STZ via ICV foram adicionados succinato 1mM e ADP 2 mM para avaliar a produção de H₂O₂ em respostas a substratos energéticos. No modelo de AO foram adicionados succinato 1mM e oligomicina 0,2ug/ml (Muller et al., 2013). Neste protocolo devido ao uso de diferentes levas de animais a média dos resultados do grupo controle foi considerada 100% e os demais comparados a este valor.

3.10 HISTOLOGIA

Imediatamente após a eutanásia, o fígado foi mergulhado em paraformaldeído 10%, em seguida as amostras incorporadas na parafina foram banhadas em álcool e xilol. Após, foram cortadas em fatias de 5 mm de espessura. Fatias de tecido hepático foram fixados e corados com hematoxilina e eosina (H & E) e analisados usando microscopia óptica. Analisado parênquima hepático, necrose celular e processo de inflamação de cada grupo (Grupos: salina, NPAu 24h e NPAu 48h).

3.11 MARCADORES DE FÍGADO E SANGUE

O sangue foi coletado após a eutanásia para determinação do colesterol total, triglicerídeos, alanina aminotransferase/transaminase glutamina pirúvica (ALT/TGP),

e aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxaloacetato (AST/TGO), nos grupos salina, NPAu 24hs e NPAu 48hs. As análises foram realizadas com kit específico, da Labtest Diagnostica S.A, usando as instruções do fabricante.

3.12 MARCADORES PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIOS

Para dosagem das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-4 foi utilizado o método enzyme-linked immunosorbent assay (DuoSet ELISA) de captura (R&D System, Inc., Minneapolis, USA) de córtex e hipocampo. As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram revestidas com anticorpo primário, seguido de lavagem e bloqueio com albumina. A curva e amostras incubadas por 2 horas e após lavagem incubadas com anticorpo de detecção conjugado com peroxidase durante 1 hora à temperatura ambiente. Após adição da enzima estreptavidina, substrato e solução de parada, a absorbância foi determinada a 450nm em espectrofotômetro. Os valores foram normalizados pela quantidade de proteína da amostra.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e à igualdade de variância (teste de Levene). Quando os testes obtiveram $p > 0,05$ para a normalidade dos dados, os valores médios foram comparados por análise de variância (ANOVA), ação que foi seguida de pos-hoc de Tukey. Também foi utilizada análise de dados repetidos para avaliar teste comportamental, seguido de teste t. Foram consideradas diferenças significativas valores com $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 HISTOLOGIA HEPÁTICA E MARCADORES DE DANO CELULAR

A segurança do tratamento foi avaliada por análise histológica do fígado e por marcadores do fígado no soro (Figura 7 e tabela 1) em uso a cada 24h e a cada 48h de NPAu 20nm na concentração de 2,5mg/kg. Os animais do grupo controle não apresentaram alterações histológicas (Figura 7A). A análise histológica do fígado, mostrou que o grupo NPAu 24h (Figura 7B) apresentou alterações acentuadas do parênquima com necrose celular e infiltração leucocitária comparado ao observado do grupo salina (Figura 7A). O grupo NPAu 48h (Figura 7C) mostrou parênquima hepático limitado com inflamação leve processos e necrose celular em relação ao observado para o grupo NPAu 24h, e mostrou morfologia semelhante ao do grupo salina.

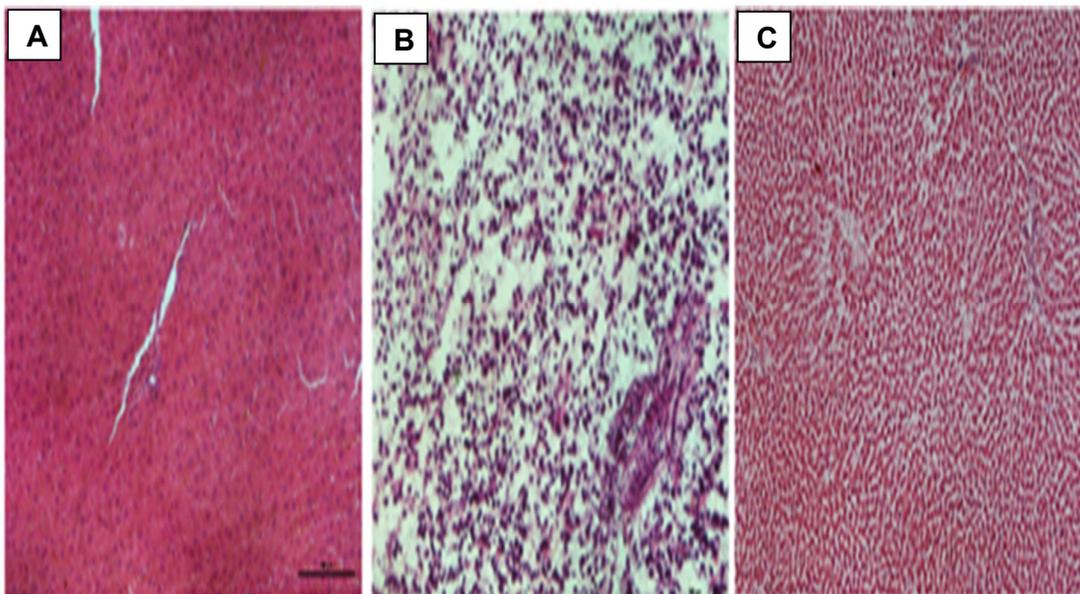


Figura 7: Histologia Hepática. Foto micrografia do fígado de ratos após administração com solução salina a cada 24hs (A) ou NPAu a cada 24hs (B) ou 48hs (C). Mostrando que no grupo NPAu 24hs (B) teve alteração de parênquima hepático comparado com grupo salina (A), o que não ocorreu no grupo NPAu 48hs (C). Original ampliação, 40 \times . Barras = 100 μ m. ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$.

Os níveis de colesterol e triglicerídeos foram inalterados no soro após a administração de NPAu em qualquer período de tempo. Os resultados semelhantes foram observados para a atividade das transaminases (AST e ALT) (Tabela 1).

Tabela 1: Níveis hepáticos e séricos de colesterol, triglicerídeos e transaminases em ratos após administração com nanopartículas de ouro a cada 24 ou 48 h, ou solução salina

Parâmetros	Salina	NPAu 24 h	NPAu 48 h
ALT/TGP Sérico (mg/dl)	24.15 ± 3	23.46 ± 3	21.20 ± 1
AST/TGO Sérico (mg/dl)	84.33 ± 4	103.01 ± 14	97.52 ± 13
Colesterol Hepático (mg/dl)	118.28 ± 8	136.34 ± 20	118.09 ± 9
Colesterol Sérico (mg/dl)	118.58 ± 3	115.95 ± 6	119.83 ± 2
Triglicerídeos Hepático (mg/dl)	160.03 ± 7	164.20 ± 13	165.16 ± 5
Triglicerídeos sérico (mg/dl)	146.12 ± 8	151.79 ± 12	156.68 ± 9

4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE STZ E TRATAMENTO COM NPAu

Após verificar a segurança e definirmos o protocolo de tratamento a cada 48h com NPAu de tamanho de 20nm e na dose de 2,5mg/kg como o mais seguro, testou-se o uso da NPAu em modelo de resistência cerebral à insulina por STZ via ICV em relação a funcionalidade da mitocôndria, cérebro total foi retirado e preparado para análise. Níveis basais de H₂O₂ foram aumentados no grupo STZ em comparação com outros grupos (Figura 8A: * STZ basal > Sham basal, NPAu basal e STZ + NPAu; p < 0,05). Para analisar a respiração mitocondrial, a atividade da CTE foi induzida por succinato. Nos grupos Sham, Sham + NPAu, STZ + NPAu, os animais apresentaram aumento na produção de H₂O₂, o que não ocorreu em animais do grupo STZ (Figura 8A: # succinato > basal em seu respectivo grupo; p < 0,05). Adicionou-se o ADP para analisar se a cadeia de transporte de elétrons estava acoplada a produção de ATP. Sham, Sham + NPAu e STZ + NPAu mostraram diminuição da produção de H₂O₂, o que não ocorreu nos animais do grupo STZ + salina (Figura 8A: & ADP < succinato em seu respectivo grupo; p <

0,05). A produção de H_2O_2 pode ser modulada por potencial membrana mitocondrial, razão pela qual analisamos o Ψ_m . Em todos os grupos houve uma indução do gradiente de prótons por succinato (Figura 8B; *succinato e succinato + ADP < basal em seu respectivo grupo; $p < 0,05$), mostrando que esses tratamentos mantêm algumas propriedades funcionais mitocôndria.

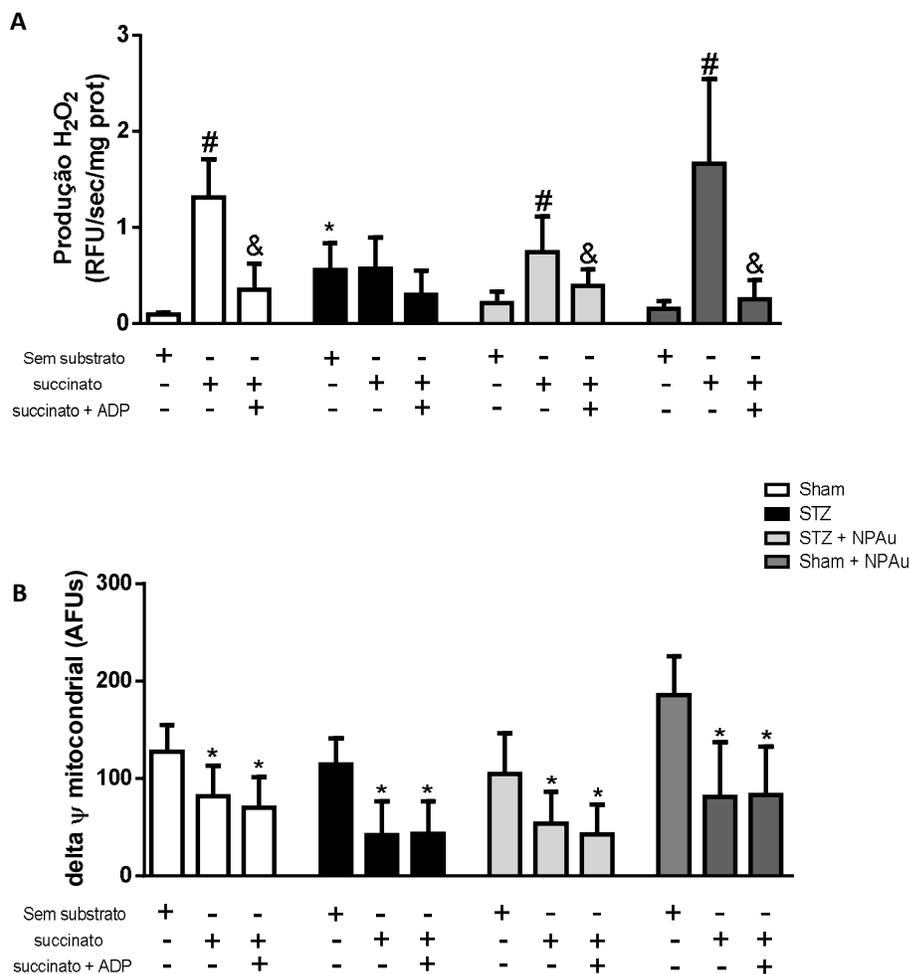


Figura 8: Função mitocondrial modelo STZ. Níveis basais de H_2O_2 foram aumentados no grupo STZ em comparação com outros grupos (Figura 8A: * STZ basal > Sham basal, NPAu basal e STZ + NPAu; $p < 0,05$). Nos grupos Sham, Sham + NPAu, STZ + NPAu, os animais apresentaram aumento na produção de H_2O_2 , o que não ocorreu em animais do grupo STZ (Figura 8A: # succinato > basal em seu respectivo grupo; $p < 0,05$). Sham, Sham + NPAu e STZ + NPAu mostraram diminuição da produção de H_2O_2 , o que não ocorreu nos animais do grupo STZ + salina (Figura 8A: & ADP < succinato em seu respectivo grupo; $p < 0,05$). Em todos os grupos houve uma indução do gradiente de prótons por succinato (Figura 8B; * succinato e succinato + ADP < basal em seu respectivo grupo). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$.

4.3 EFEITO DO STZ E DO TRATAMENTO COM NPAu EM DIFERENTES TIPOS DE MEMÓRIA

Após verificar efeitos na funcionalidade mitocondrial do tratamento com NPAu em modelo de resistência cerebral à insulina, verificamos se o tratamento poderia afetar a performance cognitiva. A memória espacial foi avaliada pelo teste de labirinto de Barnes. Durante a fase de aquisição da memória, nos 5 dias de treinamento, os grupos Sham, Sham + NPAu e STZ + NPAu apresentaram uma diminuição na latência para encontrar a caixa escape no quarto e quinto dia em relação ao primeiro dia de treino (Figura 9A: * dias treino 4 e 5 < dia 1; $p < 0.05$). Entretanto os grupos STZ não apresentaram esse aprendizado, mostrando um déficit na formação da memória induzido por STZ. Na fase de retenção da memória, no dia teste, os grupos Sham, Sham + NPAu e STZ + NPAu apresentaram um maior tempo gasto no quadrante onde estava a caixa escape quando comparado com o grupo STZ (Figura 9B: * Sham, Sham + NPAu e STZ + NPAu > STZ; $p < 0.05$), mostrando um déficit cognitivo na retenção da memória causado pelo modelo de demência neste tipo de memória.

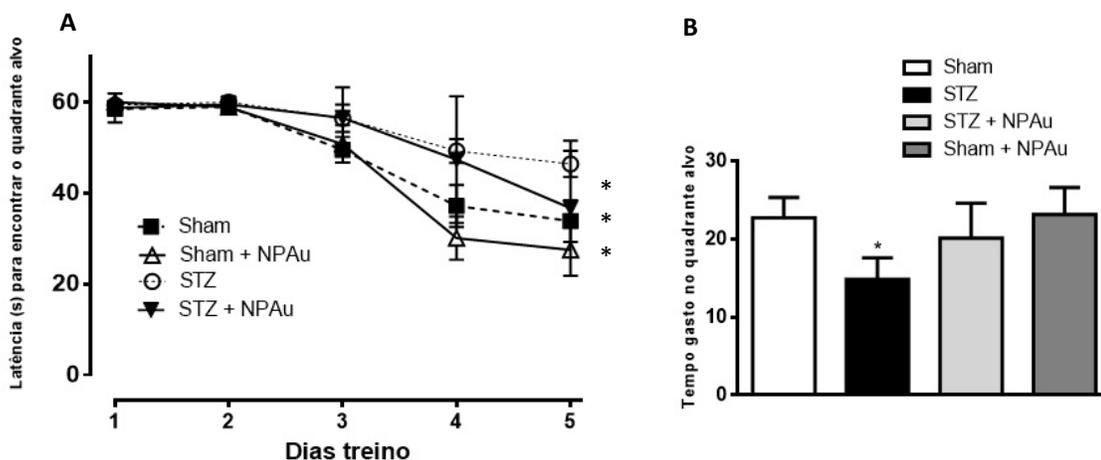


Figura 9: A memória espacial avaliada pelo teste de Barnes maze. A) Fase de aquisição (*dias treino 4 e 5 < dia 1; $p < 0,05$). B) Dia teste, fase de retenção (*Sham, Sham + NPAu 48h e STZ + NPAu 48hs > STZ; * $p < 0,05$).

Para analisar outro tipo de memória, a de reconhecimento, realizou-se a tarefa de reconhecimento de objetos. Todos os animais tiveram desempenho igual

no primeiro dia de teste (Figura 10). O segundo dia, Sham, Sham + NPAu, STZ + NPAu passaram mais tempo explorando o novo objeto (Figura 10A; * tempo gasto novo objeto > objeto antigo; $p < 0,05$) enquanto o grupo STZ explorou ambos os objetos igualmente (Figura 10B), mostrando que no STZ prejudicou o desempenho de reconhecimento e que a NPAu pode evitar esse dano.

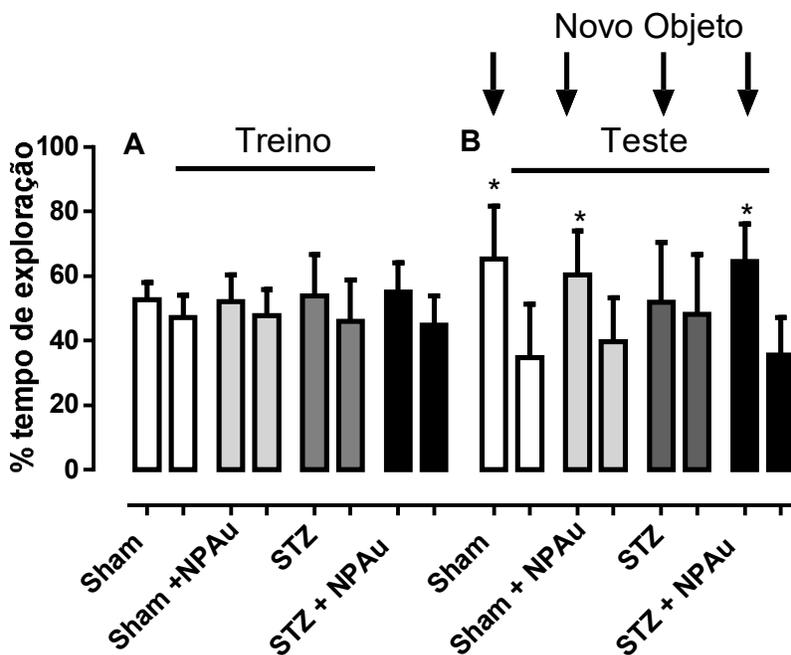


Figura 10: Teste de reconhecimento de objetos. A) Tempo dedicado à exploração durante a memória de aquisição (comparação entre objetos iguais) na tarefa de reconhecimento de objetos. B) Reconhecimento de memória durante a recuperação fase de memória (comparação entre objeto antigo e objeto novo). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$.

4.4 EFEITOS DO TRATAMENTO COM NPAu EM MODELO DE DEMENCIA INDUZIDO POR ÀCIDO OCADAICO

Utilizamos outro modelo de demência, AO que causa hiperfosforilação da tau, para verificar os efeitos das NPAu. A memória espacial foi avaliada pelo teste de labirinto aquático de Morris. Durante a fase de aquisição da memória, somente no segundo dia de treinamento os animais dos grupos AO tiveram maior tempo na latência (A) para encontrar plataforma que grupos controle (Figura 11A: * AO e AO + NPAu > Sham e Sham + NPAu; $p < 0,05$), nos outros dias os grupos não apresentaram diferença significativa entre si. Na fase de retenção da memória, no

dia teste (B), os grupos com NPAu apresentaram um maior tempo gasto no quadrante alvo que os outros grupos (Figura 11B: * NPAu e AO + NPAu > Sham e AO; $p < 0.05$).

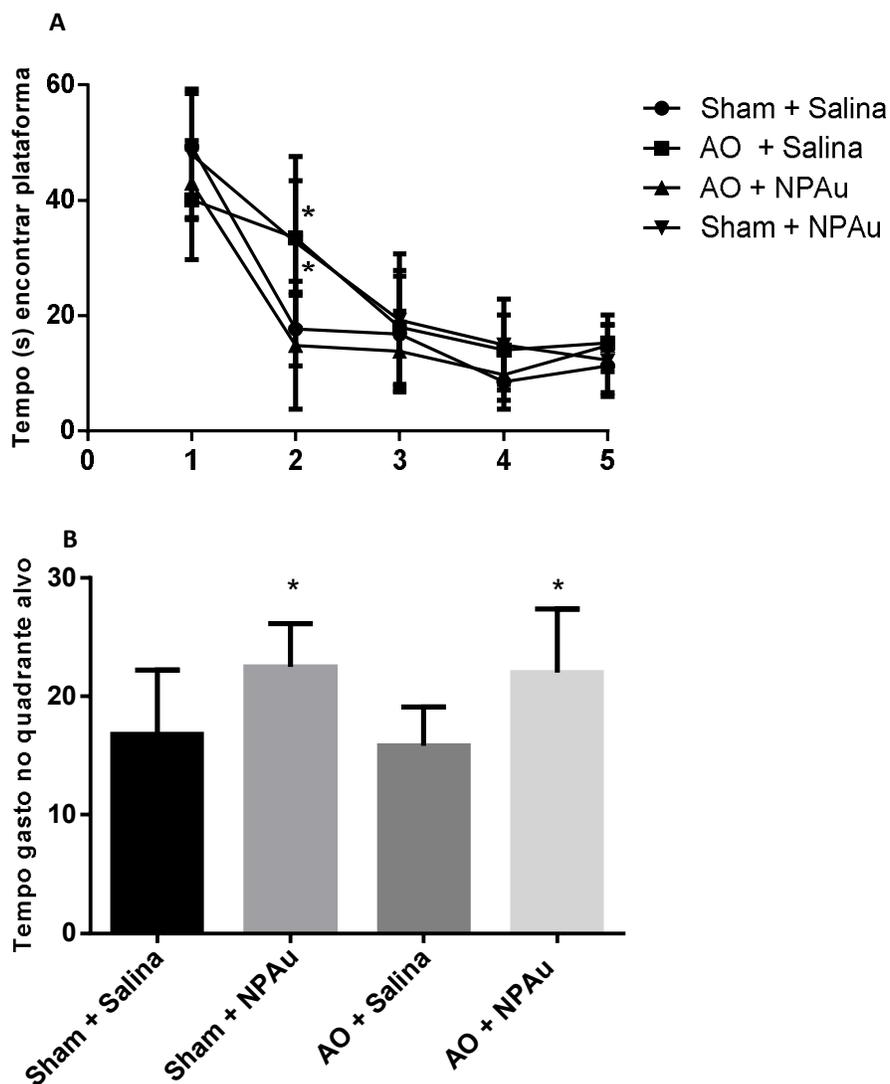


Figura 11: A memória espacial avaliada pelo teste de Water maze. A) Fase de aquisição. B) Dia teste, fase de retenção. Figura 11A: * AO e AO + NPAu > Sham e Sham + NPAu; $p < 0.05$) e figura 11B: * NPAu e AO + NPAu > Sham e AO. (A) Análise de dados repetidos; $p < 0,05$. (B) ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$.

4.5 AVALIAÇÕES DOS EFEITOS DAS NPAu EM FATORES TRÓFICOS E ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO

O modelo de AO apesar de não causar danos na memória de reconhecimento no nosso trabalho, pode induzir alterações intracelulares. Verificamos os níveis de fatores tróficos em córtex e hipocampo. Foi observado uma redução dos níveis de BDNF em hipocampo (A) e córtex (B) dos animais que receberam AO independente do tratamento (Figura 12 (A-B); AO e AO+ NPAu < Sham e Sham + NPAu; $p < 0,05$). Em relação aos níveis de NGF foi observada uma redução dos níveis de NGF em hipocampo (C) e córtex (D) dos animais que receberam AO independente do tratamento (Figura 12 (C-D); AO e AO+ NPAu < Sham e Sham + NPAu; $p < 0,05$).

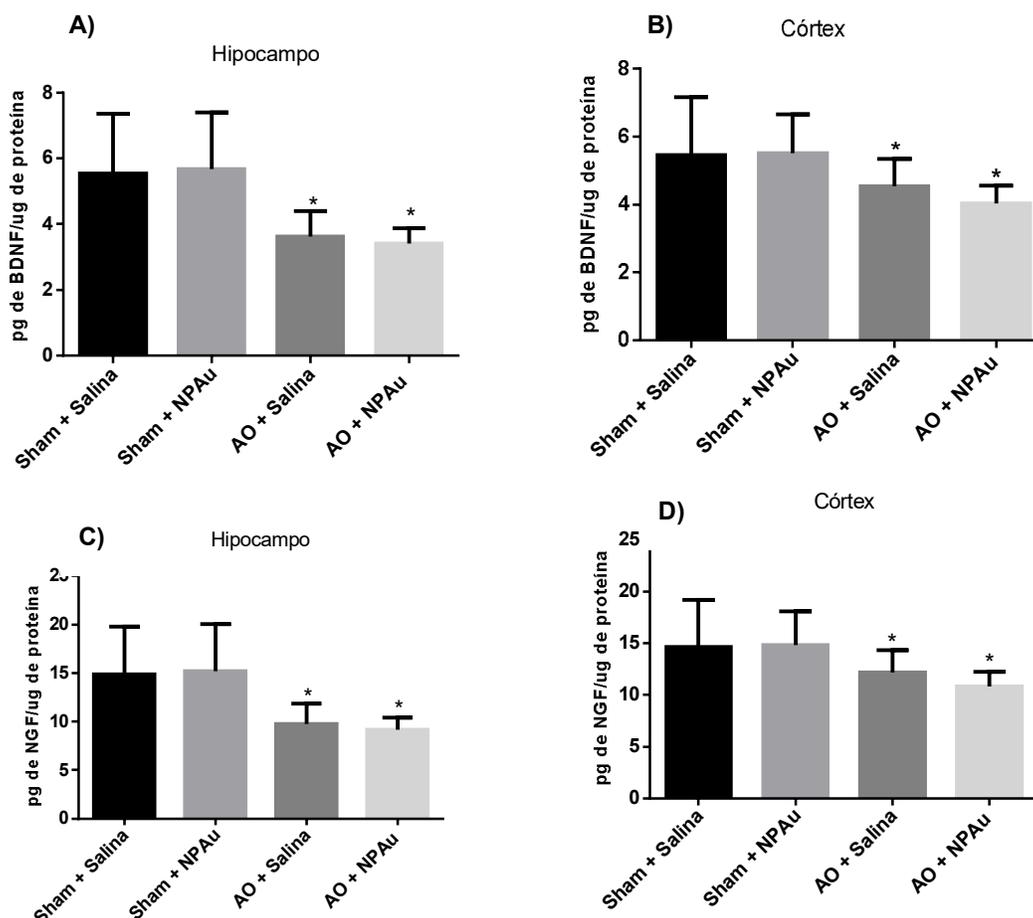


Figura 12: Avaliação dos fatores tróficos. Efeito da administração Crônica de NPAu como forma de tratamento sob modelo de demência tipo DA com AO sobre os níveis do fator de crescimento neural (NGF) em hipocampo (C) e córtex (D) de ratos Wistar. Em ambos os tecidos os níveis de BDNF e NGF estavam reduzidos quando comparados ao grupo Sham + salina. ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$.

4.6 MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Nos marcadores inflamatórios não houve diferença significativa quando avaliado os níveis de TNF- α tanto em hipocampo (13A) como em córtex (13B). Nos níveis de IL-1 β em hipocampo (13C) observou-se que o grupo AO + NPAu estavam aumentados quando comparado com os demais grupos (*AO+NPAu >Sham+Salina, Sham+NPAu e AO+Salina; $p<0,05$). Em córtex (13D) IL-1 β estava aumentada nos grupos AO+Salina e AO+NPAu quando comparado aos demais grupos (*AO+NPAu, AO+Salina >Sham+Salina e Sham+NPAu; $p<0,05$). Em hipocampo (13E) no grupo AO+NPAu os níveis de IL-4 estavam aumentados quando comparado ao grupo Sham + salina (*AO+NPAu > Sham+salina; $p<0,05$). Em córtex (13F) no grupo AO+NPAu os níveis de IL-4 estavam aumentados quando comparado com os grupos Sham+Salina e Sham+NPAu (*AO+NPAu >Sham+Salina, Sham+NPAu; $p<0,05$).

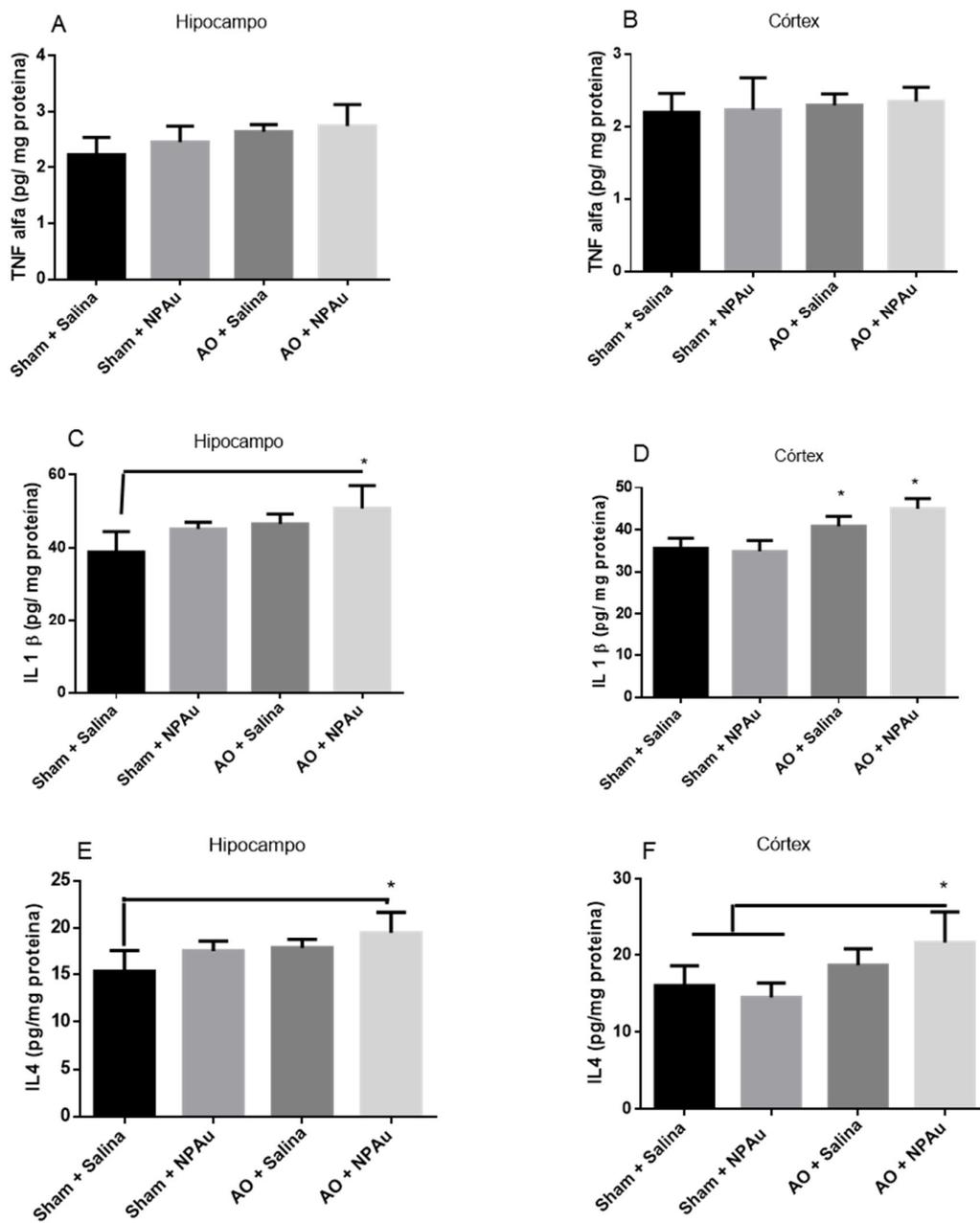


Figura 13: Avaliação dos marcadores inflamatórios. Não houve diferença significativa quando avaliado os níveis de TNF- α tanto em hipocampo (13A) como em córtex (13B). Nos Níveis de IL-1 β em hipocampo (13C) observou-se que o grupo AO + NPAu estavam aumentados quando comparado com os demais grupos (*AO+NPAu >Sham+Salina, Sham+NPAu e AO+Salina; $p < 0,05$). Em córtex (13D) IL-1 β estava aumentada nos grupos AO+Salina e AO+NPAu quando comparado aos demais grupos (*AO+NPAu, AO+Salina >Sham+Salina e Sham+NPAu; $p < 0,05$). Nos níveis de IL-4 em hipocampo (13E) o grupo AO+NPAu estava aumentado quando comparado ao grupo Sham + Salina (*AO+NPAu > Sham+Salina; $p < 0,05$). Em córtex (13F) o grupo AO+NPAu estava aumentado quando comparado com os grupos Sham+Salina e Sham+NPAu (*AO+NPAu >Sham+Salina, Sham+NPAu). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$.

4.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE AO E TRATAMENTO COM NPAu

Níveis basais de H_2O_2 não foram alterados pelos tratamentos (dados não mostrados). Para analisar a produção de H_2O_2 , a atividade da CTE foi induzida por succinato e oligomicina. No hipocampo após a administração de succinato, ocorreu um menor aumento na produção de H_2O_2 comparado com outros grupos (Figura 14A; * AO+NPAu < Sham + Salina, NPAu + Salina e AO + salina; $p < 0,05$). No córtex cerebral não ocorreu alterações entre os grupos em resposta ao succinato, entretanto quando oligomicina foi adicionada ocorreu um aumento na produção de H_2O_2 quando comparado com seu controle succinato nos grupos controle e AO + NPAu (Figura 14B; * Succinato < oligomicina $p < 0,05$). A produção de H_2O_2 pode ser modulada por potencial membrana mitocondrial, razão pela qual analisamos o Ψ_m . Não houve diferença significativa no potencial de membrana (Figura 14C e D), mostrando não alteram as propriedades funcionais da mitocôndria.

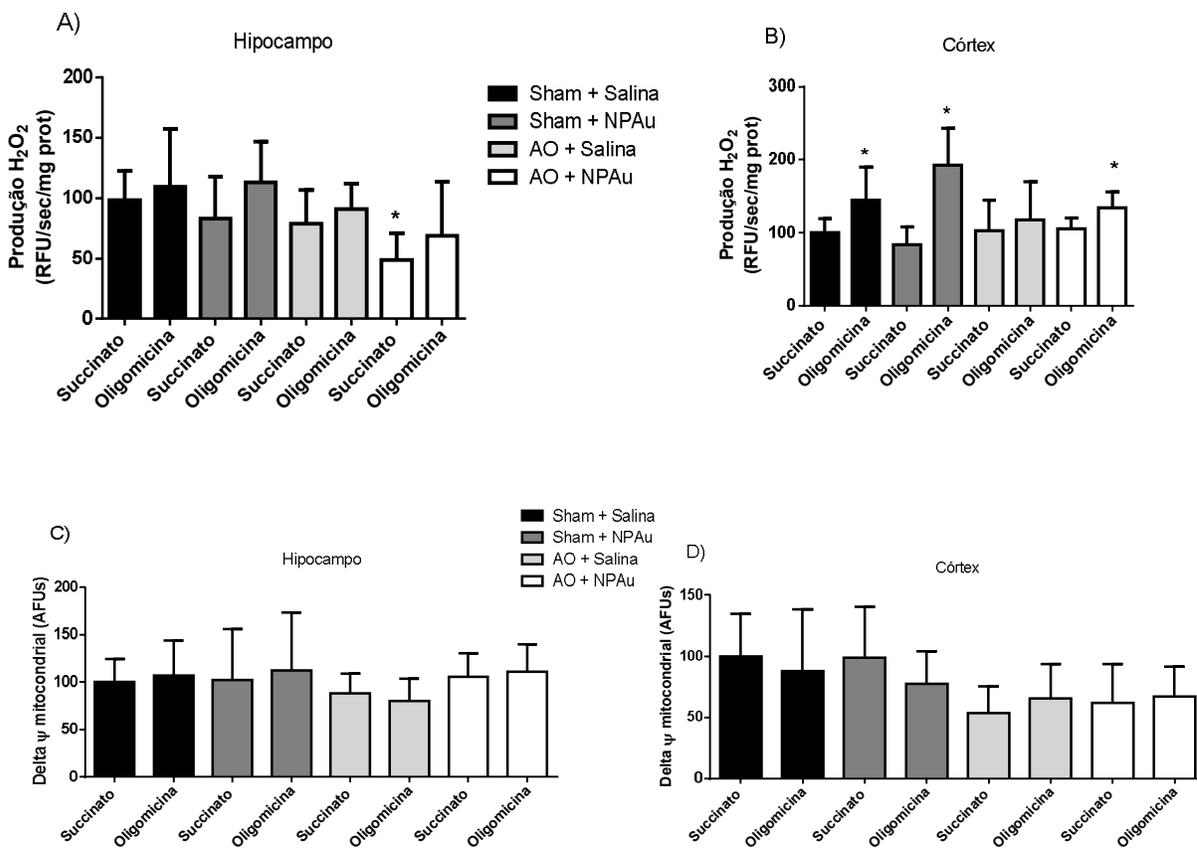


Figura 14: Função mitocondrial modelo AO. Em hipocampo (A) os resultados após a administração de Succinato, o grupo AO + NPAu estava reduzido em comparação com outros grupos ($p < 0,05$). Em córtex (B) os resultados após a administração de oligomicina, os grupos Sham + Salina, NPAu + Salina e AO + NPAu estavam aumentados em comparação com o seu mesmo grupo após administração de Succinato. Não houve diferença significativa no potencial de membrana (C e D). ANOVA de uma via, post hoc de Tukey; $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

As demências, especialmente a DA, tem se tornado cada vez mais frequentes em nossa sociedade devido ao aumento da expectativa de vida, vem se tornando uma epidemia mundial (OMS, 2012). A DA, por ser a mais prevalente, é uma das mais estudadas. Entretanto ainda não existem medicamentos que consigam reverter o curso da doença, somente medicamentos paliativos (OMS, 2012). Em nosso trabalho utilizamos as NPAu como uma terapia para dois modelos de demência do tipo DA, com resultados promissores tanto na função cognitiva dos animais como em mecanismos celulares cerebrais.

O uso de NPAu demonstra ser interessante uma vez que essas moléculas apresentam características antioxidantes e anti-inflamatórias (Paula et al., 2015) e as demências, principalmente DA, apresentam componentes em sua etiologia que envolvem esses fatores oxidantes e inflamatórios (Meraz-Ríos et al., 2013; Paviolo e Stoddart, 2017).

As NPAu por serem formadas exclusivamente de metais de ouro, um metal que pode ser de difícil depuração e excreção, podem demonstrar certa toxicidade (Noel et al., 2016). Cardoso et al. (2014) e Ferreira et al. (2017), mostraram em seus estudos que o uso crônico de NPAu, por 28 dias consecutivos, de tamanho 10 e 30nm, na dose de 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ causou dano de DNA e inibição do metabolismo energético decorrente do estresse oxidativo. Portanto caracterizar um protocolo seguro é fundamental para que essas moléculas possam ter um uso clínico. O trabalho de Pires (2015), mostrou que as NPAu administradas intraperitonealmente tem boa biodisponibilidade chegando a diversos tecidos inclusive no cérebro. Nossos resultados mostram que o uso diário, a cada 24h durante 21 dias, de NPAu 20nm na dose de 2,5mg/kg causou toxicidade ao fígado, mostrado pelos cortes histológicos que apresentaram alterações no parênquima, infiltração de leucócitos e necrose celular. Já o uso a cada 48h, com mesma dose e tamanho, não apresentou esses danos hepáticos, sugerindo ser um protocolo seguro para o uso dessas biomoléculas. Este fato deve-se ao maior tempo em que os tecidos têm para fazer a depuração dessa NPAu. Além disto, ambos os tratamentos não demonstraram alterações nos níveis hepáticos e séricos de transaminases, colesterol e triglicerídeos, não demonstrando toxicidade das NPAu. Esses resultados associados a outros dados do nosso grupo (Muller et al., 2017) apontam que o protocolo de

tratamento a cada 48h com NP Au via IP na concentração de 2,5mg/kg e de tamanho de 20nm (esférica) durante 21 dias é seguro para o uso *in vivo*.

Após a certificação da segurança do uso de NP Au no protocolo citado, verificamos se o tratamento com NP Au poderia ser eficaz em um modelo de demência induzido por STZ via ICV em relação a efeitos de função mitocondrial e comportamentais. O trabalho de Pires (2015), apontou que esse modelo de DA causa estresse oxidativo e neuroinflamação. O envelhecimento, assim como o modelo utilizado no nosso trabalho, causa uma resistência cerebral à insulina, gerando uma série de alterações neurais que incluem prejuízo do metabolismo, estresse oxidativo e inflamação, causando déficits na função cognitiva como o observado nos animais submetidos a esse modelo (Sharma e Gupta, 2001; Agrawal et al., 2009).

Diminuição da produção de ATP e prejuízos da função mitocondrial como alteração da formação do potencial de membrana mitocondrial estão associados a déficit cognitivo (Hoyer, 2000; Ishrat et al., 2006). STZ causou aumento da produção de H_2O_2 sem substrato exógeno para a mitocôndria, e quando ativamos a respiração mitocondrial com succinato, o grupo STZ não respondeu com aumento da produção de H_2O_2 , e o uso de ADP não alterou a produção de H_2O_2 , mostrando que a função mitocondrial associada à cadeia de transporte de elétrons (CTE) estava prejudicada, mesmo sem alterações no potencial de membrana. O hipometabolismo cerebral é uma das causas da DA e a diminuição da função mitocondrial em produzir ATP associado a um aumento na produção dos radicais livres estão sendo considerados como um fator chave para o surgimento de demências (Sachdeva et al., 2014). Os resultados do nosso trabalho apontam que STZ via ICV causa uma toxicidade mitocondrial uma vez que aumenta a produção basal de ERO e a ativação da CTE com substratos como succinato e ADP não alteram a atividade mitocondrial como ocorreu com os outros grupos. Uma diminuição da função mitocondrial induzida por STZ já demonstrou ser tempo dependente, onde 14 dias após indução não ocorre dano, entretanto 21 dias após, igual ao protocolo utilizado em nosso trabalho, ocorreu hipometabolismo mitocondrial cerebral que se mantém até 60 dias após indução (Zaidi e Shirwany, 2015).

A manutenção da função mitocondrial tem sido usada como uma forma de prevenir ou reverter os déficits induzidos por STZ via ICV (Arora e Deshmukh, 2017;

Li et al., 2017). O tratamento com NPAu foi capaz de prevenir o aumento de ERO basal observado nos grupos STZ via ICV, e manteve a atividade mitocondrial em resposta aos substratos mitocondriais succinato e ADP igual aos do grupo controle, demonstrando que as NPAu podem melhorar o acoplamento da cadeia de transporte de elétrons com a fosforilação oxidativa e não causam alteração no $\Delta\Psi$ mitocondrial, mantendo o aporte energético cerebral para as atividades que são necessárias para a formação da memória. São vários os grupos funcionais com afinidade para superfícies inorgânicas. O exemplo mais famoso é a afinidade do grupo tiol (-SH) pelo ouro. Além do tiol, outros grupos funcionais como o nitrilo (-CN) e amina (-NH₂) têm afinidade por nanopartículas metálicas, e esta característica tem sido útil no âmbito da funcionalização das nanopartículas (Huang et al., 2005; Costa, 2015). Ainda, as NPAu atuam como agente redutor, auxiliando no processo energético celular (Huang et al., 2005a; Salnikov et al., 2007). Um dos principais locais de geração de ERO é no complexo I da CTE (Halliwell, 2001), apontando que este pode ser um possível local de ação da NPAu em prevenir os danos oxidativos de doenças (Siddiqi et al., 2012).

O modelo de STZ via ICV causa danos em diversas formas de aprendizado e memória, e isto é ocasionado por estresse oxidativo, diminuição da atividade colinérgica, diminuição do metabolismo e fluxo sanguíneo cerebral (Bokare et al., 2018). O trabalho de Pires 2015 mostrou que o modelo STZ via ICV apresentou características de estresse oxidativo e inflamação, e que NPAu conseguiram prevenir estes danos. Em nosso trabalho verificamos que as NPAu além de efeitos moleculares também apresentaram efeitos comportamentais prevenindo o déficit cognitivo nos animais induzidos ao modelo de demência. Durante a fase de aquisição da memória o grupo STZ não diminuiu a latência para encontrar a caixa escape comparada com o primeiro dia de teste, e as NPAu conseguiram fazer com que os animais nesse modelo, respondessem de uma maneira similar aos grupos controle, mostrando que esses animais tinham a capacidade de adquirir essa memória. Estes animais quando testados, para evocar a memória que tinham adquirido durante os dias de treino, foram capazes de responder de maneira igual aos animais controles, diferentemente do grupo STZ via ICV que não foi capaz de lembrar onde estava o local de escape. O STZ induziu prejuízo na memória espacial avaliado no teste de Barnes Maze. Yamini et al. (2018), utilizou vitamina E como um

agente antioxidante e anti-inflamatório, e pode observar a redução dos níveis inflamatórios, estresse oxidativo e a manutenção da função da CTE, prevenindo o dano cognitivo, assim como aconteceu em nosso trabalho. Li et al. (2017), avaliou outro tipo de memória, a aversiva pelo teste de evasão passiva, e o STZ causou prejuízo da performance somente 8 dias após a indução de DA, o estudo utilizou azul de metileno ($C_{16}H_{18}ClN_3S$), um fármaco que é utilizado em casos de mudanças mentais decorrente de hipóxia, e mostrou melhora na função da CTE e manteve os níveis de ATP intrahipocampal, onde preveniu os efeitos deletérios.

O prejuízo na memória de reconhecimento é outro tipo de fator marcante na DA (Weissberger et al., 2017). STZ via ICV causa déficit cognitivo nesta memória (Bassani et al., 2017), este processo se inicia a partir de 3 semanas, como usado neste trabalho, e se mantém por até 15 semanas (Rostami et al., 2017). Os déficits cognitivos induzidos por esse modelo se dão tanto na memória de curta duração (Deshmukh et al., 2016) como na memória de longa duração (Muller et al., 2012) como também foi observado em nosso trabalho, e o uso de NPAu conseguiu prevenir este efeito, mostrando eficiência em prevenir um dos sintomas mais presentes em paciente com DA (Lanea et al., 2018). Nossos resultados apontam para um efeito protetor mitocondrial das NPAu, que poderá auxiliar na proteção do déficit cognitivo induzido por resistência cerebral à insulina, tanto na memória espacial como na memória de reconhecimento.

Após assegurar a eficácia do uso de NPAu em modelo de resistência à insulina cerebral testamos o uso dessa biomolécula em um modelo de demência induzido por AO. O AO, é um inibidor de proteínas fosfatase (PP), principalmente a PP2A (Zhang e Simpkins, 2010), inibe a defosforilação da proteína Tau, gerando hiperfosforilação e emaranhados neurofibrilares, sendo um modelo utilizado para mimetizar o dano cognitivo e a perda de memória observado em pacientes com DA (Cohen et al., 1990). No trabalho de Souza (2017), mostramos que o AO induziu déficit na memória espacial, no labirinto de Barnes, associado ao aumento do estresse oxidativo, avaliado por diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e aumento de marcadores pro-oxidantes. O estudo de Souza (2017), também mostrou que a dose de NPAu de 2,5mg/kg é mais efetiva em prevenir os danos cognitivos e marcadores de estresse oxidativo em regiões cerebrais que uma dose de 5mg/kg. Portanto usamos a dose de 2,5mg/kg a cada 48h para verificar seu efeito na

memória espacial/aversiva, neuroinflamação e neurotrofinas em córtex e hipocampo de ratos.

As NPAu mesmo quando usadas periféricamente ultrapassam a barreira hematocefálica e afetam a formação de placas A β *in vivo* (Gao et al., 2017), entretanto os mecanismos, e de que forma elas afetam o hipocampo e córtex cerebral ainda são escassos. Este efeito das NPAu pode direcionar uma possível nova estratégia terapêutica para o tratamento de demências, tipo DA, que envolvam disfunção dessas regiões cerebrais. Avaliando a função mitocondrial no córtex cerebral, os nossos resultados mostraram que os níveis basais, sem adição de substrato para CTE, e a produção de H₂O₂, estavam similares em todos os grupos. A ativação da respiração mitocondrial causou um aumento semelhante na produção de H₂O₂ em todos grupos, mostrando que a CTE estava funcionando independente dos tratamentos. Entretanto, quando inibimos a fosforilação oxidativa com a oligomicina, que é um inibidor da ATP sintase, ocorreu um aumento na produção de H₂O₂ nos grupos controle e AO+NPAu quando comparados com seu mesmo grupo somente com succinato. No grupo AO não ocorreu esse aumento mostrando que mesmo com a atividade do CTE normal o AO poderia afetar a atividade desta enzima e diminuir a produção de ATP, e as NPAu foram eficientes em prevenir este efeito. A formação do potencial de membrana mitocondrial induzido por succinato não foi afetada pelos tratamentos, mostrando a integridade das membranas mitocondriais.

No hipocampo, os níveis basais de H₂O₂ estavam similares (dados não mostrados) e a ativação da CTE com succinato causou efeitos similares nos grupos controle e AO, contudo no grupo AO+NPAu ocorreu uma menor produção de H₂O₂ mostrando que tratamento com NPAu pode proteger esta estrutura de um possível excesso de produção de ERO em modelo de demência. Um resultado surpreendente foi que o uso de oligomicina não produziu alterações nos níveis de produção de H₂O₂ neste tecido. A formação do potencial de membrana mitocondrial induzido por succinato não foi afetado pelos tratamentos, mostrando a integridade das membranas mitocondriais. O AO na dose de 200 μ g mostrou indução de disfunção mitocondrial por aumentar da produção de ERO, alteração no metabolismo do cálcio e na formação do potencial de membrana mitocondrial em cérebro total de ratos após 13 dias de sua aplicação (Kamat et al., 2011). Com isso,

acredita-se que a dose e o tempo de avaliação poderiam explicar a diferença entre os resultados do nosso estudo, mas no mesmo estudo houve uma diminuição da concentração de ATP em cérebro de ratos, o que está de acordo com nossos resultados se considerarmos a atividade da ATP sintase como um marcador da produção de energia (Kamat et al., 2011).

A dinâmica mitocondrial, fissão e fusão, também são afetadas pelo AO em cultura de neurônios, mostrando que esse composto tem uma ação direta nesta organela no SNC (Cho et al., 2012), além de causar estresse de retículo, um fator atualmente associado diretamente com maior formação de ERO e demências (Placido et al., 2017). Nossos resultados apontam que as NPAu podem afetar positivamente a funcionalidade da mitocôndria, protegendo as mitocôndrias cerebrais em modelos de demência, mantendo a sinergia entre CTE e fosforilação oxidativa dando um suporte energético para o cérebro, sendo um possível alvo terapêutico dessas biomoléculas.

O ouro tem uma capacidade antioxidante já descrita (Tsai et al., 2007) e as NPAu atuam como um efetivo agente antioxidante por inibirem a formação de ERO, sequestrando radicais livres e melhorando a ação de enzimas antioxidantes (BarathManiKanth et al., 2010; Sul et al., 2010). A taupatia atinge diretamente o centro da memória e da cognição que envolve o hipocampo e córtex, responsáveis por manter intacta a consciência e funções cognitivas. Portanto, danos nessas regiões geram alterações nos estados afetivos como: expressões de raiva, alegria, tristeza e ternura (Pennartz et al., 2009; Sestieri et al., 2017), características observadas em demências do tipo DA, que têm como característica fisiopatológica a taupatia (McDonald e Hong, 2013.).

A memória espacial, com um componente aversivo no modelo de AO, avaliada pelo labirinto aquático de Morris, ao contrário do modelo de STZ via ICV, não apresentou a mesma diferença durante a fase de aquisição da memória, onde somente no segundo dia de teste houve prejuízo da memória nos grupos AO independente do tratamento com NPAu, a partir do terceiro dia todos os grupos mostraram a mesma performance. A dose de 100ug, quatro semanas após sua injeção, também não afetou a fase de aquisição da memória no trabalho de Li et al. (2014). O uso de AO 100ug causou déficit cognitivo no teste do labirinto aquático 6 dias após sua injeção (Zimmer et al., 2012). O trabalho de Rajasekar et al. (2013),

mostrou que AO nas doses de 50 e 100ug causaram dano na aquisição, entretanto foi avaliado 13 dias após sua injeção. Esses dados permitem especular que o tempo pós injeção de AO pode ser um fator essencial para avaliação da memória espacial no labirinto aquático. Durante a evocação da memória, no dia teste, os animais com NPAu mostraram melhorar a performance, mesmo no grupo AO, mostrando que as NPAu tem capacidade de melhorar a formação da memória em animais controles e submetidos ao AO. Nossos resultados não apontaram um déficit cognitivo nos animais AO na dose de 100ug ICV, mas apontaram para um efeito benéfico na cognição mesmo em animais controles, colocando as NPAu como um possível modulador de mecanismo de memória, e apontando como uma molécula que pode trazer benefícios para cognição, mesmo sem o desenvolvimento de doenças, como ocorre no envelhecimento.

Os processos de aquisição e manutenção da memória de longa duração são regulados por fatores de neurotransmissão, sinápticos, neurogenese e fatores tróficos (Stranahan et al., 2008). Fatores de crescimento, como BDNF e NGF, estão envolvidos no processo de formação de novos neurônios, sinapses, diferenciação, maturação e sobrevivência das células do SNC, tanto em humanos quanto em animais, portanto são moduladores da plasticidade cerebral que podem apresentar diminuição da sua ação em modelos animais de DA e durante o envelhecimento (Von Bohlen Und Halbach e Von Bohlen Und Halbach, 2018). Em nosso trabalho os níveis destes fatores neurotróficos, BDNF e NGF foram diminuídos pelo AO independente do uso das NPAu tanto em córtex quanto em hipocampo. Apesar de não ter observado um prejuízo cognitivo induzido por AO no tempo em que foi avaliado, esta diminuição de neurotrofinas nos grupos AO pode mostrar que um dos mecanismos de dano deste modelo seja a diminuição da produção de fatores tróficos pelo AO. O uso de AO 24h em cultura de neurônios induziu a diminuição na produção de BDNF via um mecanismo de diminuição da sinalização da via PI3K/Akt, uma via reconhecida de sobrevivência e neurogênese (Atasoy et al., 2017). Um modelo de neuroinflamação por lipopolissacarídeo (LPS) não diminuiu os níveis de BDNF em hipocampo apesar de causar neuroinflamação (Guan e Fang, 2006).

As NPAu não aumentaram a síntese desses fatores neurotróficos, portanto o mecanismo protetor ou potencializador na função cognitiva das NPAu, como observado em nosso trabalho, provavelmente não é causado pelo aumento da

síntese de neurotrofinas, ou pelo menos, não no período em que foi avaliado em nosso trabalho. Talvez no início do dano causado pelo AO ou dos testes cognitivos possa ter ocorrido uma modulação nesses fatores, que não conseguimos detectar, proposta que deve ser melhor investigada em outros estudos. Além disso, as vias de sinalização intracelular desses fatores podem estar aumentadas e isto merece novas análises. Entretanto já foi demonstrado neste trabalho que as NPAu aumentam a funcionalidade da mitocôndria e por outros trabalhos que elas diminuem o estresse oxidativo (Pires, 2015; Souza, 2017), portanto podemos propor que a via principal de melhora da função cognitiva pelas NPAu sejam através de melhorarem a capacidade mitocondrial cerebral, propiciando um melhor aporte energético, capacidade de impedir o cálcio de causar excitotoxicidade e evitar o estresse oxidativo (Parbo et al., 2017).

A neuroinflamação pode causar efeitos deletérios como apoptose, dano mitocondrial, estresse oxidativo, gerando a cronicidade e perpetuando a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias (Ferreira et al., 2014). A resposta neuroinflamatória induz a contínua liberação de citocinas inflamatórias a partir de algum insulto inicial e é mais relevante no contexto do desenvolvimento de doenças no SNC, como na DA, Parkinson e Huntington (Akiyama et al., 2000). O processo inflamatório cerebral pode afetar vias de sinalização de neurotransmissores, que diminuem a formação de novas memórias e consolidação do aprendizado, conseqüentemente prejudicando a memória de longa duração (Lourenço et al., 2013). A neuroinflamação prolongada pode ser uma das principais causas das disfunções e déficits cognitivos observados em doenças que tenham essa causa na sua etiologia e também no envelhecimento, uma vez que afeta áreas do cérebro envolvidas nos processos cognitivos como córtex e hipocampo, deixando os neurônios dessas regiões mais vulneráveis a degeneração (Barrientos et al., 2012). A ativação microglial e liberação de citocinas como IL-1 β , IL-6, e TNF- α diminui a neurogênese e causa prejuízo cognitivo (Rostami et al., 2017).

Condições neuroinflamatórias crônicas afetam a progressão da DA, portanto medicamentos que atuem como anti-inflamatórios são necessários para o tratamento eficaz da doença. TNF- α e IL-6 tem sido relatado por induzirem alterações associadas a DA e como marcadores de inflamação em pacientes com

DA (Kim et al., 2017.), contudo nossos resultados não mostraram alterações nos níveis de TNF- α no hipocampo e córtex por nenhum tratamento. A neuroinflamação ativa a microglia e inflamassomas que secretam fatores inflamatórios como a IL-1 β que também está sendo relatado como indutor da inflamação em pacientes com DA (White et al., 2017). Em um modelo de DA por A β , ICV, houve aumento de IL-1 β e déficit cognitivo, e um composto com atividade anti-inflamatória diminuiu esses valores e foi capaz de restaurar a performance cognitiva (Nutchareeporn et al., 2017). Os nossos resultados mostraram que a IL-1 β foi aumentada por AO e NPAu em hipocampo e pelo AO no córtex, mostrando uma ativação das células de defesa cerebrais nesses tecidos. Atualmente se discute se a ativação da microglia está associada somente com neurodegeneração ou se tem um papel essencial para o cérebro inclusive na formação de memória e em processos anti-inflamatórios, sendo essencial a ativação dessas células para a manutenção da saúde cerebral (Ransohoff, 2016). Propomos que o aumento da produção de IL-1 β como fator inflamatório é uma resposta natural e necessária da microglia em resposta ao agente estressor, no caso AO, e que o uso de NPAu ativaria ainda mais essas células de defesa para proteger o hipocampo e córtex. A IL-1 β foi recentemente associada com plasticidade hipocampal e necessária para a formação de memória no teste de labirinto aquático e sua deleção causa déficit cognitivo (Takako et al., 2017), mostrando uma nova função dessa citocina que sempre foi reconhecida por causar dano inflamatório.

O processo inflamatório crônico pode causar danos ao cérebro e deve ser combatido por um mecanismo de defesa anti-inflamatório, que também pode ser feita por células da glia (Gyun e Kyoungcho, 2017) e por outras células de defesa do corpo. A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória, que diminui a ação e sinalização de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 e diminui o processo inflamatório crônico, causando a polarização da microglia para o fenótipo do tipo 2 anti-inflamatório (Casella et al., 2016). O trabalho mostrou que a IL-4 não foi afetada pela NPAu ou AO isoladamente, entretanto foi aumentada por NPAu no grupo AO+NPAu tanto em hipocampo como em córtex, apontando que as NPAu poderiam aumentar a síntese de fatores anti-inflamatórios no cérebro para proteger contra insultos que causam inflamação e demência. Em um modelo de doença de Parkinson o uso terapêutico de IL-4 foi capaz de proteger neurônios dopaminérgicos por ativar a microglia para

polarização M2, sendo um fator anti-inflamatório (Hühner et al., 2017). As NPAu diminuem a sinalização inflamatória por inibir a via do TNF- α e isto auxilia também na diminuição do estresse oxidativo (Lai et al., 2016). Pereira et al. (2012), utilizou as NPAu para combater os efeitos inflamatórios do LPS, e mostrou que as mesmas formam capazes de reduzir a sinalização inflamatória por interferir na via TLR4-NF- κ B. Nossos resultados apontam um novo mecanismo de neuroproteção da NPAu por aumentar a síntese de IL-4 e causar uma ativação benéfica da micróglia. Esses resultados apontam que, apesar de AO não causar déficit cognitivo e neuroinflamação como mostrado no trabalho de Kamat et al. (2012), isto pode ter sido por causa do tempo de avaliação após a injeção da droga, mas que as NPAu ativaram a micróglia de hipocampo e córtex, ativando a plasticidade necessária para a proteção cerebral e ativando mecanismos que combatem os efeitos deletérios da inflamação.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste trabalho, pode-se dizer que as NPAu, na dose de 2,5mg/kg, de tamanho 20nm, morfologia esférica, e utilizadas por 21 dias, com intervalo de 48hs, aplicadas por via IP, aparentou não causar prejuízo hepático, sérico, oxidativo e mitocondrial.

Os resultados também mostram que as NPAu quando utilizadas no tratamento para prevenir o desenvolvimento das condições fisiopatológicas causadas pelos dois modelos de demência utilizado em nesse estudo apresentou melhora no quadro inflamatório, oxidativo, cognitivo e na função energética mitocondrial, mostrando ser uma nanomolécula promissora para o tratamento dessas demências. No entanto, mais estudos ainda são necessários para descartar qualquer efeito colateral que nosso trabalho não conseguiu observar.

7 PERSPECTÍVAS

- Propor tempos diferentes de aplicação das NPAu;
- Avaliar cascata de sinalização para determinar possíveis vias de ação do tratamentocom NPAu;
- Realizar novos testes comportamentais para melhor compreender o mecanismo de prevenção ao dano de memória;
- Analisar dano de DNA utilizando a dose e os modelos utilizados utilizados neste trabalho ;
- Analisar via de excreção das NPAu, mensurando a quantidade eliminada e o tempo necessário para eliminação total no corpo;
- Analisar possível toxicidade hematológica provocada pela NPAu.

REFERÊNCIAS

Agrawal R., Tragi E., Shukla R., Nath C., A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia, **Neuropharmacol**, 2009 779–787.

Ahmed N. Zahid S, Oellerich M, Asif AR, Differential expression of proteins in brain regions of Alzheimer's disease patients. **Neurochem Res**. 2014 Jan;39:208-15.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**. 2000 May-Jun;21(3):383-421.

Alzheimer A. Über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. **Centralbl f Nerv und Psych**. 1907; 30:177-79.

Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. **Cereb Cortex** 1991; 1:103-16.

Arora R, Deshmukh R. Embelin Attenuates Intracerebroventricular Streptozotocin-Induced Behavioral, Biochemical, and Neurochemical Abnormalities in Rats. **Mol Neurobiol**. 2017 Nov;54(9):6670-6680

Atasoy İL, Dursun E, Gezen-Ak D, Metin-Armağan D, Öztürk M4, Yılmaz S. Both secreted and the cellular levels of BDNF attenuated due to tau hyperphosphorylation in primary cultures of cortical neurons. **J Chem Neuroanat**. 2017 Mar;80:19-26

Banks, WA, Owen, JB, Erickson, MA. Insulin in the brain: there and back again. **J. Pharmacol. Exp. Ther**. 2012, 136, 82-93

BarathManiKanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SRK, Youn H, Eom S, Gurunathan S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. **J Nanobiotechnol**. 2010; 8: 16.

Barrientos RM, Frank MG, Watkins LR, Maier SF. Aging-related changes in neuroimmune-endocrine function: implications for hippocampal-dependent cognition. **Horm Behav.** 2012 Aug;62(3):219-27.

Bassani TB, Turnes JM, Moura ELR, Bonato JM, Cópola-Segovia V, Zanata SM, Oliveira RMMW, Vital MABF. Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type. **Behav Brain Res.** 2017 Sep 29;335:41-54.

Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. **Adv. Drug Delivery Rev.** 2008, 60: 1289–1306..

Blazquez, E, Velazquez, E, Hurtado-Carneiro, V, and Ruiz-Albusac, J M. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Trends Endocrinol. Metab.** 2014, 5, 161

Bond M, Rogers G, Peters J, Anderson R, Hoyle M, Miners A, Moxham T, Davis S, Thokala P, Wailoo A, Jeffreys M, Hyde C. The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model. **Health Technol Assess.** 2012; 16:1-470.

Bokare AM, Bhonde M, Goel R, Nayak Y. 5-HT₆ receptor agonist and antagonist modulates ICV-STZ-induced memory impairment in rats. **Psychopharmacol.** 2018 Mar 3.

Burmester, G.-R., Molecular mechanisms of action of gold treatment in rheumatoid arthritis — an update. **Z. Rheumatol.** 2004, 60, 167–173.

Cai Q, Tammineni P. Mitochondrial Aspects of Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis.** 2017;57(4):1087-1103.

Cardoso E, Rezin GT, Zanoni ET, de Souza Notoya F, Leffa DD, Damiani AP, Daumann F, Rodriguez JC, Benavides R, da Silva L, Andrade VM, da Silva Paula MM. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause DNA damage in the cerebral cortex of adult rats. **Mutat Res.** 2014 Aug-Sep;766-767:25-30.

Casella G, Garzetti L, Gatta AT, Finardi A, Maiorino G, Ruffini F, Martino G, Muzio L, Furlan R. IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo. **J Neuroinflam** 2016, 13:139

Chen H, Dorrigan A, Saad S, Hare DJ, Cortie MB, Valenzuela SM. In vivo study of spherical gold nanoparticles: inflammatory effects and distribution in mice. **PLoS One**. 2013; 8(2):e58208.

Chen KH, Reese EA, Kim HW, Rapoport SI, Rao JS. Disturbed neurotransmitter transporter expression in Alzheimer's disease brain. **J Alzheimers Dis**. 2011; 26:755-66.

Chircorian, A., Barrios, A.M., Inhibition of lysosomal cysteine proteases by chrysotherapeutic compounds: a possible mechanism for the antiarthritic activity of Au(I). **Bioorg. Med**. 2004, 14, 5113–5116.

Cho MH, Kim DH, Choi JE, Chang EJ, Seung-Yongyoon. Increased phosphorylation of dynamin-related protein 1 and mitochondrial fission in okadaic acid-treated neurons. **Brain Res**. 2012 May 15;1454:100-10.

Claeysen S, Cochet M, Donneger R, Dumuis A, Bockaert J, Giannoni P. Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay. *Cell Signal*. 2012; 24:1831-40.

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

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

Correia SC, Santos RX, Perry G, Zhu X, Moreira PI, Smith MA. Insulin-Resistant Brain State: the culprit in sporadic Alzheimer's Disease? **Ageing Res Rev**. 2011; 10: 264–273.

Costa, JDS. Síntese e caracterização toxicológica de diferentes tipos de nanopartículas de ouro: Estudos in vitro e in vivo. Acessado dia 25/05/2018, disponível em https://sigarra.up.pt/fmup/pt/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=433932

Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Hum Mol Genet**. 2010; 19:12-20.

Crutcher Ka, Gendelman He, Kipnis J, Perez-Polo Jr, Perry Vh, Popovich Pg, Weaver Lc. Debate: "is increasing neuroinflammation beneficial for neural repair?" **J Neuroimmune Pharmacol**. 2009, 1:195-211.

Custodio N, Wheelock A, Thumala D, Slachevsky A. Dementia in Latin America: Epidemiological Evidence and Implications for Public Policy. **Front Aging Neurosci**. 2017; 9: 221.

Daniel Mc, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical reviews**. 2004, 104: 293–346.

Danysz W, Parsons CG. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. **Br J Pharmacol**. 2012; 167:324-52.

De La Monte Sm, Longato L, Tong M, Wands Jr. Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. **Curr Opin Investig Drugs**. 2009, 10: 1049-60

De La Monte Sm, Wands Jr. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**. 2005; 7:45-61.

De Martinis M, et al. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. **FEBS Lett**. 2005, 579: 2035-9

Deshmukh R, Kaundal M, Bansal V, Samardeep. Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. **Biomed Pharmacother**. 2016 Jul;81:56-62

Di Carlo M, Giacomazza D, San Biagio PL. Alzheimer's disease: biological aspects, therapeutic perspectives and diagnostic tools. **J Phys Condens Matter**. 2012; 24:244102

Dohnert, M.B., Venâncio, M. Possato, J.C. Zeferino, R.C. Dohnert, L.H. Zugno, A.I. De Souza, C.T. Paula, M.M.S. Luciano, T.F. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis, *Int. J. Nanomedicine*. 2012, 111-14

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

Donohue MC, Sperling RA, Salmon DP, Rentz DM, Raman R, Thomas RG, Weiner M, Aisen PS. The Preclinical Alzheimer Cognitive Composite: Measuring Amyloid-Related Decline. **JAMA Neurol.** 2014, Aug;71(8):961-70

Du TT, Chen YC, Lu YQ, Meng FG, Yang H, Zhang JG. Subthalamic nucleus deep brain stimulation protects neurons by activating autophagy via PP2A inactivation in a rat model of Parkinson's disease. **Exp Neurol.** 2018 May 21. pii: S0014-4886(18)30127-4

Fadeel, B. Garcia-Bennett, A.E. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2010, 362–374

Ferreira St, Clarke Jr, Bomfim Tr, De Felice Fg. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement.** 2014; 10 S76-83.

Ferreira GK, Cardoso E, Vuolo FS, Galant LS, Michels M, Gonçalves CL, Rezin GT, Dal-Pizzol F, Benavides R, Alonso-Núñez G, Andrade VM, Streck EL, da Silva Paula MM. Effect of acute and long-term administration of gold nanoparticles on biochemical parameters in rat brain. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.** 2017 Oct 1;79:748-755.

Fulop T, Larbi A, Douziech N. Insulin receptor and ageing. **Pathol Biol.** 2003; 51:574-80.

Gao G, Zhang M, Gong D, Chen R, Hua X, Sun T. The size-effect of gold nanoparticles and nanoclusters in the inhibition of amyloid- β fibrillation. **Nanoscale,** 2017, 9, 4107-4113

Galvin JE, Sadowsky CH. Practical guidelines for the recognition and diagnosis of dementia. **J Am Board Fam Med.** 2012; 25:367-82.

Ghasemi, R., Dargahi, L., Haeri, A., Moosavi, M., Mohamed, Z., Ahmadiani, A. Brain insulin dysregulation: implication for neurological and neuropsychiatric disorders. **Mol neurobiol.** 2013, 47, 1045-1065

Goedert M, Klug A, Crowther RA. Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis.** 2006; 9:195-07.

Goedert M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. **Trends Neurosci.** 1993; 16:460-5.

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

Guan Z, Fang J. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. **Brain Behav Immun.** 2006 Jan;20(1):64-71.

Gyun Jee Song, Kyoungso Suk. Pharmacological Modulation of Functional Phenotypes of Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Front Aging Neurosci.** 2017; 9: 139.

Grünblatt E, Koutsilieri E, Hoyer S, Riederer P. Gene expression alterations in brain areas of intracerebroventricular streptozotocin treated rat. **J Alzheimers Dis.** 2006 Aug;9(3):261-71.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging.** 2001, 685–716.

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

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

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

Hollander J; Bejma J; Ookawara T; Ohno H; Ji LI. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. **Mech Ageing Dev.** 2000, v.116, p. 33-45.

Hoyer S, Brain glucose and energymetabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update, **Exp. Gerontol.** 2000, 1363–1372.

Huang X., El-Sayed I.H., Yi X., El-Sayed M.A., Gold nanoparticles: catalyst for the oxidation of NADH to NAD(+), **J. Photochem. Photobiol.** 2005a 76–83.

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

Hughes A., Musher J., Thomas S.K., Beusterien K.M., Strunk B., Arcona S., Gastrointestinal adverse events in a general population sample of nursing home residents taking cholinesterase inhibitors, **Consult. Pharm.** 2004, 19:713–720.

Hühner L, Rilka J, Gilsbach R, Zhou X, Machado V, Spittau B. Interleukin-4 Protects Dopaminergic Neurons In vitro but Is Dispensable for MPTP-Induced Neurodegeneration In vivo. **Front Mol Neurosci.** 2017; 10: 62.

Hyman BT, VanHoesen GW, Kromer LJ, Damasio AR. Perforant pathway changes in the memory impairment of Alzheimer's disease. **Ann Neurol.** 1986; 20:472-81.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. **Acta Neuropathol.** 2009; 118:53-69.

Ishrat T, Khan M.B., Hoda M.N., Yousuf S., Ahmad M., Ansari M.A., Ahmad A.S., Islam F, Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats, **Behav. Brain Res.** 171 2006, 9–16.

Izquierdo I, Bevilacqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci.** 2006; 29:496-505.

Jain, P.K. Huang, X. El-Sayed, I.H. El-Sayed, M.A. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems, **Plasmonics.** 2007, 107–118.

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

Kamat PK, Rai S, Nath C, Shukla R. Molecular and Cellular Mechanism of Okadaic Acid (OKA)-Induced Neurotoxicity: A Novel Tool for Alzheimer's Disease Therapeutic Application. **Mol Neurobiol.** 2014. 50:852-65.

Kamat PK, Tota S, Rai S, Swarnkar S, Shukla R, Nath C. A study on neuroinflammatory marker in brain areas of okadaic acid (ICV) induced memory impaired rats. **Life Sci.** 2012 May 22;90(19-20):713-20

Kamat PK, Tota S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Mitochondrial dysfunction: a crucial event in okadaic acid (ICV) induced memory impairment and apoptotic cell death in rat brain. **Pharmacol Biochem Behav.** 2011 Dec;100(2):311-9.

Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. **Nature.** 1963; 197:192-3.

Kim YS, Lee KJ, Kim H. Serum tumour necrosis factor- α and interleukin-6 levels in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Psychogeriatrics.** 2017 Jul;17(4):224-230.

Klucken J, McLean PJ, Gomez-Tortosa E, Ingelsson M, Hyman BT. Neuritic alterations and neural system dysfunction in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. **Neurochem Res.** 2003; 28:1683-91.

Kroner, Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? **Al med rev.** 2009, 14, 373-379

Lai TH, Chung CH, Chen BH, Hung CF, Inbaraj BS, Ma MC, Chen HM, Tsou CJ, Wu PH, Wu WB. Gold Nanoparticles Compromise TNF- α -Induced Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression Through NF- κ B and Protein Degradation Pathways and Reduce Neointima Formation in A Rat Carotid Balloon Injury Model. **J Biomed Nanotechnol.** 2016 Dec;12(12):2185-01.

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

Lanea CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. **Eur J Neurol.** 2018 Jan;25(1):59-70.

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

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

Li H, Wu X, Wu Q, Gong D, Shi M, Guan L, Zhang J, Liu J, Yuan B, Han G, Zou Y. Green tea polyphenols protect against okadaic acid-induced acute learning and memory impairments in rats. *Nutrition.* 2014 Mar;30(3):337-42.

Li L, Qin L, Lu HL, Li PJ, Song YJ, Yang RL. Methylene blue improves streptozotocin-induced memory deficit by restoring mitochondrial function in rats. *Brain Res.* 2017 Feb 15;1657:208-214.

Li X, Hu Z, Ma J, Wang X, Zhang Y, Wang W, Yuan Z. The systematic evaluation of size-dependent toxicity and multi-time biodistribution of goldnanoparticles. *Coll Surf Bio.* 2018 Apr 4;167:260-266.

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

Lourenco MV, Clarke JR, Frozza RL, Bomfim TR, Fornry-Germano L, Batista AF, Sathler LB, Brito-Moreira J, Amaral OB, Silva CA, Freitas-Correa L, Espírito-Santo S, Campello-Costa P, Houzel JC, Klein WL, Holscher C, Carvalheira JB, Silva AM, Velloso LA, Munoz DP, Ferreira ST, De Felice FG. TNF- α mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's β -amyloid oligomers in mice and monkeys. *Cell Metab.* 2013 Dec 3;18(6):831-43.

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

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

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

Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. **Ann N Y Acad Sci.** 2008; 1144:97-12.

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

Medeiros R, Figueiredo CP, Pandolfo P, Duarte FS, Prediger RD, Passos GF, Calixto JB. The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. **Behav Brain Res.** 2010; 209:165-73.

Medzhitov R, Janeway C Jr: Advances in immunology: innate immunity. **N Engl J Med** 2000, 343:338-344.

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

Meraz-Ríos MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. **Front Integr Neurosci.** 2013 Aug 13;7:59.

Muller AP, Ferreira GK, da Silva S, Nesi RT, de Bem Silveira G, Mendes C, Pinho RA, da Silva Paula MM, Silveira PCL. Safety protocol for the gold nanoparticles administration in rats. **Sci Eng C Biol Appl.** 2017 Aug 1;77:1145-1150.

Muller AP, Haas CB, Camacho-Pereira J, Brochier AW, Gnoatto J, Zimmer ER, de Souza DO, Galina A, Portela LV. Insulin prevents mitochondrial generation of H₂O₂ in rat brain. **Exp Neurol.** 2013 Sep;247:66-72.

Muller AP, Zimmer ER, Kalinine E, Haas CB, Oses JP, Martimbianco de Assis A, Galina A, Souza DO, Portela LV. Physical exercise exacerbates memory deficits induced by intracerebroventricular STZ but improves insulin regulation of H₂O₂ production in mice synaptosomes. **J Alzheimers Dis.** 2012;30(4):889-98.

Muller, A.P., et al. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. **Hippocampus.** 2011, 21,1082–1092.

Navarro, M., Fraile, G., Velásquez, M., González, E., Escalona, J., Ilanjan, R., Abad, M.J., Taylor, P., Effect of a gold-chloroquine complex on inflammation-related leukocyte functions and cell viability. Comparison with auranofin. **Arzneimittelforschung**. 2006, 56, 826–833.

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

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

Nilton Custodio, Ana Wheelock, Daniela Thumala, Andrea Slachevsky. Dementia in Latin America: Epidemiological Evidence and Implications for Public Policy. **Front Aging Neurosci**. 2017; 9: 221.

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

Noël C, Simard JC, Girard D. Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. **Toxicol In Vitro**. 2016 Mar;31:12-22.

Nutchareeporn N, Wanassanun P, Jariya UW, Wunnee C, Kittisak S, Bungorn S. Neuroprotective Effects of Aged Garlic Extract on Cognitive Dysfunction and Neuroinflammation Induced by β -Amyloid in Rats. **Nutrients**. 2017 Jan; 9(1): 24.

Octave JN, Pierrot N, Ferao Santos S, Nalivaeva NN, Turner AJ. From synaptic spines to nuclear signaling: nuclear and synaptic actions of the amyloid precursor protein. **J Neurochem**. 2013; in press.

OMS – Organização mundial da saúde. Dementia cases set to triple by 2050 but still largely ignore. Geneva: World Health Organization; 11/04/2012. Acessado em 10 de janeiro de 2014. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/dementia_20120411/en/index.html?utm_source=twitterfeed&utm_medium=twitter.

Parbo P, Ismail R, Hansen KV, Amidi A, Mårup FH, Gottrup H, Brændgaard H, Eriksson BO, Eskildsen SF, Lund TE, Tietze A, Edison P, Pavese N, Stokholm MG, Borghammer P, Hinz R, Aanerud J, Brooks DJ. Brain inflammation accompanies

amyloid in the majority of mild cognitive impairment cases due to Alzheimer's disease. **Brain**. 2017 Jul 1;140(7):2002-2011.

Paula MM, Petronilho F, Vuolo F, Ferreira GK, De Costa L, Santos GP, Eftting PS, Dal-Pizzol F, Dal-Bó AG, Frizon TE, Silveira PC, Pinho RA. Gold nanoparticles and/or N-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner. **J Biomed Mater Res A**. 2015 Oct;103(10):3323-30.

Paviolo C, Stoddart PR. Gold Nanoparticles for Modulating Neuronal Behavior. **Nanomaterials**. 2017 Apr 24;7(4).

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Second edition). Academic Press, **Sydney**; 1982.

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

Pellerin L. Brain energetics (thought needs food). **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. 2008 Nov;11(6):701-5

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

Pereira DV, Petronilho F, Pereira HR, Vuolo F, Mina F, Possato JC, Vitto MF, de Souza DR, da Silva L, da Silva Paula MM, de Souza CT, Dal-Pizzol F. Effects of gold nanoparticles on endotoxin-induced uveitis in rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2012 Dec 7;53(13):8036-41.

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

Plácido AI, Pereira CM, Correia SC, Carvalho C, Oliveira CR, Moreira PI. Phosphatase 2A Inhibition Affects Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Homeostasis Via Cytoskeletal Alterations in Brain Endothelial Cells. **Mol Neurobiol**. 2017 Jan;54(1):154-168

Popovich Pg, Longbrake Ee: Can the immune system be harnessed to repair the CNS? **Nat Rev Neurosci**. 2008, 9:481-93.

Rajasekar N, Dwivedi S, Tota SK, Kamat PK, Hanif K, Nath C, Shukla R. Neuroprotective effect of curcumin on okadaic acid induced memory impairment in mice. **Eur J Pharmacol**. 2013 Sep 5;715(1-3):381-94

Ransohoff RM A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? **Nat Neurosci**, 2016, 987–991

Ravelli KG, Rosário BD, Camarini R, Hernandes MS, Britto LR. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. **Neurotox Res**. 2017 Apr;31(3):327-333.

Reddy H, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. **Trends Mol Med**. 2008; 14:45-53.

Rivest S: Regulation of innate immune responses in the brain. **Nat Rev Immunol**. 2009, 9:429-39.

Rostami F, Javan M, Moghimi A, Haddad-Mashadrizeh A, Fereidoni M. Streptozotocin-induced hippocampal astrogliosis and insulin signaling malfunction as experimental scales for subclinical sporadic Alzheimer model. **Life Sci**. 2017 Nov 1;188:172-185.

Sachdeva AK, Kuhad A, Chopra K. Naringin ameliorates memory deficits in experimental paradigm of Alzheimer's disease by attenuating mitochondrial dysfunction. **Pharmacol Biochem Behav**. 2014 Dec;127:101-10.

Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. **J Neural Transm Suppl**. 2007;(72):217-33.

Salkovic-Petrisic M, Tribl F, Schmidt M, Hoyer S, Riederer P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **J Neurochem**. 2006 Feb;96(4):1005-15.

Salnikov V., Lukyanenko Y.O., Frederick C.A., Lederer W.J., Lukyanenko V., Probing the outer mitochondrial membrane in cardiac mitochondria with nanoparticles, **Biophys. J.** 92 (2007) 1058–1071.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Psychol Rev.** 2001; 81:741-66.

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harb. Perspect.** 2010; 1:a006189.

Sestieri C, Shulman GL, Corbetta M. The contribution of the human posterior parietal cortex to episodic memory. **Nat Rev Neurosci.** 2017 Feb 17;18(3):183-192.

Schipper HM. Apolipoprotein E: implications for AD neurobiology, epidemiology and risk assessment. **Neurobiol Aging.** 2011; 32:778-90.

Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment, **Life Sci.** 68 2001, 1021–1029.

Siddiqi NJ, Abdelhalim MA, El-Ansary AK, Alhomida AS, Ong WY. Identification of potential biomarkers of gold nanoparticle toxicity in rat brains, **J. Neuroinflammation** 9 (2012) 123.

Song YY , Suk DH. Seasonal changes of optical absorption properties of river and lake in East Liaohe River basin, Northeast China. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.** 2017 Jun 18;28(6):2013-2023.

Souza, RA. Avaliação dos efeitos da administração crônica de nanopartículas de ouro sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em modelo de taupatia em ratos. 2017. Acessado dia 20/04/2018, disponível em <http://repositorio.unesc.net/handle/1/5195>

Sperling, R.A. Rivera gil, P. Zhang, F. Zanella, M.. Parak, W.J. Biological applications of ACCEPTED MANUSCRIPT ACCEPTED MANUSCRIPT gold nanoparticles, **Chem. Soc. Rev.** 2008, 1896–1908.

Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration. **Lancet Neurol.** 2013; 12:609-22.

Spires-Jones TL, Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. **Neuron**. 2014; 82:756-71.

Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. **Nat Neurosci**. 2008 Mar;11(3):309-17

Streit, WJ, Mrak, RE, Griffin, W Sue T. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. **J Neuroinflam**. 2004, 1:14.

Sul OJ, Kim JC, Kyung TW, Kim HJ, Kim YY, Kim SH, Kim JS, Choi HS. Gold nanoparticles inhibited the receptor activator of nuclear factor-kb ligand (RANKL)-induced osteoclast formation by acting as an antioxidant. **Biosci Biotech Biochem**. 2010;74(11):2209-13.

Swerdlow RH. Bioenergetics and metabolism: a bench to bedside perspective. **J Neurochem**. 2016 Oct;139 Suppl 2:126-135.

Takako T, Kumiko F, Kanato Y, Yoichiro I, Marumi K. Brain Interleukin-1 Facilitates Learning of a Water Maze Spatial Memory Task in Young Mice. **Front Behav Neurosci**. 2017; 11: 202.

Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Mol Neurobiol**. 2016 Mar;53(2):1181-94.

Tedesco, S. Doyle, H. Blasco, J. Redmond, G. Sheehan, D. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*, **Aquat. Toxicol**. 2010, 178–186.

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

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

Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**. 2017;57(4):1105-1121.

Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY, Chen DH, Chou CH, Wang CR, Wu CL. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. **Arthritis Rheum.** 2007 Feb;56(2):544-54.

Turkevich, J, Stevenson, PC. and Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discuss Faraday Soc.** 1951, 11: 55-75.

Villemagne VL, Doré V, Burnham SC, Masters CL, Rowe CC. Imaging tau and amyloid- β proteinopathies in Alzheimer disease and other conditions. **Nat Rev Neurol.** 2018 Feb 16.

Victor, E.G.. Silveira, P.C.L Possato, J.C. da Rosa, G.L. Munari, U.B. de Souza, C.T. Pinho, R.A. da Silva, L.. Streck, E.L Paula, M.M.S. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury, **J. Nanobiotechnology.** 2012, 10-11.

Von Bohlen Und Halbach O, von Bohlen Und Halbach V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. **Cell Tissue Res.** 2018 Feb 15.

White CS, Lawrence CB, Brough D, Rivers-Auty J. Inflammasomes as therapeutic targets for Alzheimer's disease. **Brain Pathol.** 2017 Mar;27(2):223-234.

Wilkin Ld, Merrick Ma, Kirby Te. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. **Inter J Sports Medic.** 2004, 25: 73-77.

Yamini P, Ray RS, Chopra K. Vitamin D3 attenuates cognitive deficits and neuroinflammatory responses in ICV-STZ induced sporadic Alzheimer's disease. **Inflammopharmacol.** 2018 Feb;26(1):39-55.

Yan W, Chen B, Mahurin SM, Schwartz V, Mullins DR, Lupini AR, Pennycook SJ, Dai S, Overbury SH. Preparation and comparison of supported gold nanocatalysts on anatase, brookite, rutile, and P25 polymorphs of TiO₂ for catalytic oxidation of CO, **J. Phys. Chem. B** 109 (2005) 10676–10685.

Yang W, Han H, Hu X, Feng G, Qian Y. The effects of perindopril on cognitive impairment induced by D-galactose and aluminum trichloride via inhibition of acetylcholinesterase activity and oxidative stress. **Pharmacol Biochem Behav.** 2013; 115:31-6.

Yang, JP, Merin, JP, Nakano, T, Kato, T, Kitade, Y, Okamoto, T. Inhibition of the DNA-binding activity of NF-kappa B by gold compounds in vitro. **FEBS Lett.** 1995, 361, 89–96.

Yin F, Sancheti H, Patil I, Cadenas E. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med.** 2016 Nov;100:108-122.

Zhang Z, Simpkins JW. An okadaic acid-induced model of tauopathy and cognitive deficiency. **Brain Res.** 2010 Nov 4;1359:233-46.

Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics.** 2010; 7:399-412.

Wilquet V, De Strooper B. Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. **Curr Opin Neurobiol.** 2004; 14:582-8.

Zaidi SI, Shirwany TA. Relationship of serum resistin with insulin resistance and obesity. **J Ayub Med Coll Abbottabad.** 2015 Jul-Sep;27(3):552-5.

Zhang, CX, Lippard, SJ., New metal complexes as potential therapeutics. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 2003, 7, 481–489.

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

Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. **Mol Neurodegener.** 2006; 1:5.

Zhou L, Hou Y, Yang Q, Du X, Li M, Yuan M, Zhou Z. Tetrahydroxystilbene glucoside improves the learning and memory of amyloid- $\beta_{(1-42)}$ injected rats and may be connected to synaptic changes in the hippocampus. **Can J Physiol Pharmacol.** 2012; 90:1446-55.

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

ANEXO: CARTA DE APROVAÇÃO CEUA