

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

SABRINA DA SILVA

**ESTUDO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DA D-
GALACTOSE SOBRE PARÂMETROS DE MEMÓRIA E NÍVEIS
DE NEUROTROFINAS EM CÉREBRO DE RATOS WISTAR**

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2014.

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

SABRINA DA SILVA

**ESTUDO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DA D-
GALACTOSE SOBRE PARÂMETROS DE MEMÓRIA E NÍVEIS
DE NEUROTROFINAS EM CÉREBRO DE RATOS WISTAR**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Josiane Budni
Coorientador: Prof. Dr. João Quevedo

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2014.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586e Silva, Sabrina da.

Estudo do efeito da administração oral da D-Galactose sobre parâmetros de memória e níveis de neurotrofinas em cérebro de ratos wistar / Sabrina da Silva; orientador: Josiane Budni, coorientador: João Quevedo. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

83 p : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014.

1. Alzheimer, Doença de. 2. Galactose. 3. Fatores neutróficos. 3. Envelhecimento. 4. Memória. I. Título.

CDD. 22ª ed. 613.2

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

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

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

PARECER

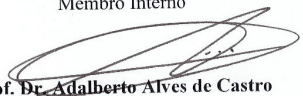
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata **Sabrina da Silva** sob o título “**Estudo do efeito da administração oral da D-galactose sobre parâmetros de memória e níveis de neurotrofinas em cérebro de ratos Wistar**” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

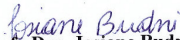
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

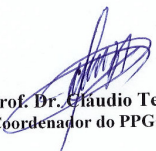
Criciúma, SC, 04 de agosto de 2014


Profa. Dra. Patricia Fernanda Schuck
Membro Relator


Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira
Membro Interno


Prof. Dr. Adalberto Alves de Castro
Membro Externo


Profa. Dra. Josiane Budni
Orientadora


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

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

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências 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 também por eu estar gozando de uma saúde perfeita.

Aos meus pais, Renato da Silva e Rejane Cruz da Silva, e à minha família, agradeço todo o amor, carinho, compreensão e respeito.

Às minhas irmãs Samantha e Gabriela, pelo carinho de todos os dias, e ao meu Irmão Ismael, por mostrar que devemos fazer o que amamos e não que os outros acham que devemos fazer.

Aos amigos que fiz neste último ano e aos que revi de outros tempos. Aos amigos dos demais laboratórios que fui conquistando a cada dia. Em especial aos meus colegas e amigos da Neurodegeneração, “meus” pupilos IC’s que eu amo tanto. E meu agradecimento a toda a equipe do Neurolab que me recebeu tão bem desde o primeiro dia.

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 e Dona Elige que sempre me socorreram nos experimentos, e além disso a amizade que construímos nesse ano e que perdure.

Agradeço a grande ajuda que minhas amigas do coração Francielle Mina e Sharon Freitas me deram, ajuda de todas as formas, obrigada mesmo, amo vocês muito.

Ao professor Dr. João Quevedo por aceitar ser meu coorientador, meu muito obrigado.

Agradeço a banca que se faz presente nesse momento tão especial Prof^ª Patrícia, Prof^º Paulo e Dr. Adalberto, muito obrigada por aceitarem.

E finalmente à minha orientadora, Josiane Budni, que me dedicou todo seu carinho, atenção, conhecimento e muita paciência nessa etapa importante da minha vida e, claro, na elaboração desta dissertação.

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

Claude Bernard

RESUMO

O envelhecimento é uma etapa do desenvolvimento humano em que ocorre um processo de transformação do organismo, caracterizada por alterações físicas, psicológicas e sociais do indivíduo. Essas alterações podem desencadear neurodegeneração, como na doença de Alzheimer (DA), caracterizada por perda progressiva de memória e diminuição de várias funções cognitivas, sendo um processo associado à perda de neurônios e perda sináptica, com consequentes respostas inflamatórias, anormalidades mitocondriais e plasticidade neuronal marcadamente reduzida, que levam a prejuízos na memória. Perda da plasticidade neuronal e danos de memória são características comuns no envelhecimento e na DA, e podem estar associados à redução nos níveis de neurotrofinas. Contudo, pouco se sabe o papel das neurotrofinas no processo de envelhecimento e DA. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis das neurotrofinas fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) e fator de crescimento do nervo (NGF), além da memória de ratos submetidos ao modelo animal de DA pela administração crônica oral, diariamente uma vez ao dia de D-galactose (D-gal) (100 mg/kg) durante 1, 2, 4, 6 e 8 semanas. Para tal, foram utilizados ratos Wistar machos adultos. Para avaliação da memória, os animais foram submetidos ao teste de esquiwa inibitória de múltiplos treinos ao final de 1, 2, 4, 6 e 8 semanas de tratamento com D-gal e 24hs após a última administração de D-gal, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina e foram dissecadas as estruturas cerebrais hipocampo e córtex pré-frontal, para avaliação dos níveis de neurotrofinas. Os resultados obtidos demonstraram que os animais tiveram redução de memória apenas na curva de 4 semanas de tratamento com D-gal, quando comparado ao seu grupo controle. Os níveis de BDNF aumentaram em hipocampo e córtex pré-frontal na 1 e 2 semanas de tratamento com D-gal. Porém, houve uma diminuição dos níveis desta neurotrofina em córtex pré-frontal em 4, 6 e 8 semanas de tratamento quando comparado aos seus respectivos controles. Os níveis de NGF encontraram-se aumentados após 1 e 2 semanas de tratamento com D-gal nas duas estruturas e diminuíram apenas em córtex pré-frontal após 6 e 8 semanas de tratamento. Os níveis de GDNF em hipocampo encontraram-se aumentados em 1 semana e diminuídos após 8 semanas de tratamento com este monossacarídeo. Em córtex pré-frontal, houve diminuição deste fator neurotrófico apenas após 4, 6 e 8 semanas de tratamento com D-gal, quando comparado aos controles. Com isso, pode-se sugerir que a administração oral de D-gal pode

causar comprometimento cognitivo e redução dos níveis de fatores neurotróficos em animais, podendo mimetizar alterações semelhantes ao envelhecimento e DA.

Palavras-chave: Envelhecimento, Doença de Alzheimer, Fator Neurotrófico Memória, Galactose.

ABSTRACT

Aging is a stage of human development, which is part of an organism's change process and it is characterized by physical, psychological and social alterations. These alterations can trigger neurodegeneration, as in Alzheimer's Disease (AD), with progressive memory loss and decrease of several cognitive functions associated to neuron and synaptic loss, with subsequent inflammatory responses, mitochondrial abnormalities and a significant reduction of neuronal plasticity, leading to memory impairment. Neuronal plasticity loss and memory damage are common factors of aging and AD, and can be associated to decrease of neurotrophins levels. However, little is known about the role of neurotrophins on aging and AD processes. Thus, the aim of the present study was to evaluate the levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF), glial derived neurotrophic factor (GDNF) and nerve growth factor (NGF), as well as memory of rats subjected to an animal model of AD induced by oral administration of D-galactose (D-gal) (100 mg/kg, once a day) for 1, 2, 4, 6 and 8 weeks. Male adults Wistar rats were used for this study. The animals were subjected to continuous multiple trials step-down on inhibitory avoidance test, to evaluation of memory, in the end of 1, 2, 4, 6 and 8 weeks treatment, and 24 hours after the last D-gal administration the animals were subjected to euthanasia by guillotine decapitation and the brain was dissected to obtain the hippocampus and prefrontal cortex to determination of neurotrophins levels. The results showed that the animals manifested memory impairment only after 4 weeks of D-gal treatment when compared to the control group. BDNF levels were increased in hippocampus and prefrontal cortex after 1 and 2 weeks of D-gal treatment. However, these neurotrophins levels were decreased in prefrontal cortex after 4, 6 and 8 weeks treatment when compared to respective control groups. NGF levels were increased after 1 and 2 weeks after the D-gal treatment in both brain structures and decreased only in prefrontal cortex after 6 and 8 weeks of treatment. GDNF levels were increased in hippocampus after 8 weeks of treatment with this monosaccharide. A decrease of this neurotrophic factor in the prefrontal cortex was seen only after 4, 6 and 8 weeks after the D-gal treatment when compared to control group. Thus, it can be suggested that oral D-gal administration may cause cognitive impairment and decrease of neurotrophic factors levels in animals, mimic alterations found aging and AD.

Key-words: Aging, Alzheimer's Disease, Neurotrophic Factor, Memory, Galactoses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo da galactose responsável pela interconversão da galactose em glicose na via de Leloir e vias acessórias.....	32
Figura 2 - Esquema de sinalização da via do BDNF.....	38
Figura 3 - Protocolo esquemático do tratamento com D-galactose por via ora durante 1(A), 2(B), 4(C), 6(D) e 8(E) semanas em ratos Wistar.....	43
Figura 4 - Efeito da administração crônica com D-galactose (D-gal) durante 1(A), 2(B), 4(C), 6(D) e 8(E) semanas de tratamento por via oral sobre a memória aversiva avaliada através da tarefa de esquiva inibitória.....	48
Figura 5 - Efeito da administração crônica com D-galactose (D-gal) durante 1, 2, 4, 6 e 8 semanas de tratamento por via oral sobre os níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos Wistar.....	50
Figura 6 - Efeito da administração crônica com D-galactose (D-gal) durante 1, 2, 4, 6 e 8 semanas de tratamento por via oral sobre os níveis do fator de crescimento neural (NGF) em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos Wistar.....	52
Figura 7 - Efeito da administração com D-galactose (D-gal) durante 1, 2, 4, 6 e 8 semanas de tratamento por via oral sobre os níveis do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos Wistar.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA – Análise de variância simples (do inglês analysis of variance)
- APP – Proteína precursora amiloide (do inglês amyloid precursor protein)
- APPs – Proteína precursora amiloide secretases (do inglês amyloid precursor protein secretases)
- Art – Artenina
- A β – Beta amiloide (do inglês amyloid- β)
- BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês Brain Derived Neurotrophic Factor)
- BMP – Proteína morfogenética do osso (do inglês Bone Morphogenetic Protein)
- CNTF – Fator neurotrófico ciliar (do inglês Ciliary neurotrophic factor)
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CT-1 – Cardiotrofina
- DA – Doença de Alzheimer
- D-gal – D-galactose
- EGF – Fator de crescimento epidermal (do inglês Epidermal growth factor)
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- EUA – Estados Unidos da América
- FGF-1 – Fator ácido de crescimento fibroblástico 1 (do inglês Fibroblast growth factor 1)
- FGF-2 – Fator básico de crescimento fibroblástico 2 (do inglês Fibroblast growth factor 2)
- FNEC – Anticorpo de coelho monoclonal anti-FNEC
- GALE – galactose-4-epimerase
- GALK – galactocinase (do inglês galactokinase)
- GALM – galactose mutarrotase
- GALT – galactose -1-fosfato uridiltransferase
- GDNF – Fator neurotrófico derivado de células gliais (do inglês Glial cell-derived neurotrophic factor)
- GP130 – Glicoproteína 130, proteína transmembrana/receptor de citocinas
- IACHÉ – Inibidores da atividade da enzima acetilcolinesterase (do inglês Inhibitors of acetylcholinesterase activity)
- IGF – Fator de crescimento tipo insulina (do inglês Insulin-like growth factor)
- IL-6 – Interleucina 6 (do inglês interleukin 6)

LIFR β /LIF – Fator inibidor de leucemia (do inglês Leukemia inhibitory factor)

MCD – Memória de curta duração

MI – Memória imediata

MLD – Memória de longa duração

NGF – Fator de crescimento do nervo (do inglês Nerve growth factor)

NMDA - N-metil-D-aspartato

NT – Neurotrofinas

NTN – Neurturina

OMS – Organização mundial da saúde

p.o – Por via oral (do latim per os)

PSP – Persefina (do inglês persephin)

P75 NTR – Receptor de neurotrofinas (do inglês neurotrophin receptor p75)

RET – Receptor tirosina

TFG – Receptor do fator de crescimento (do inglês Growth factor receptor)

Trk – Cinase do receptor de tropomiosina (do inglês Tropomyosin receptor kinase)

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 ENVELHECIMENTO.....	23
1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	24
1.3 MEMÓRIA, ENVELHECIMENTO E DA.....	29
1.4 D-GALACTOSE.....	31
1.4.1 D-galactose, envelhecimento e DA.....	33
1.5 FATORES NEUROTROFICOS.....	35
1.5.1 Fatores neurotróficos, envelhecimento e DA.....	39
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 ANIMAIS.....	42
3.1.1 Administração de D-gal.....	42
3.1.2 Esquiva inibitória.....	43
3.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE BDNF, NGF E GDNF.....	44
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 TESTE COMPORTAMENTAL.....	46
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	49
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é uma etapa do desenvolvimento humano em que ocorre um processo de transformação do organismo, caracterizada por mudanças físicas, psicológicas e sociais do indivíduo (Zhang et al., 2014). Pode ser entendido como uma etapa do processo natural da vida, cuja característica principal é acentuada perda da capacidade de adaptação e menor expectativa de vida. Esta condição torna o indivíduo mais vulnerável e predisposto a morbidades e mortalidade (Borba et al., 2012). As despesas per capita com a saúde de pessoas idosas são de 3 a 5 vezes maior do que aquelas destinadas às pessoas jovens trabalhadoras e crianças (Hartman et al., 2008).

Embora as teorias evolutivas do envelhecimento sejam bem estabelecidas, o conhecimento sobre como ocorre é ainda limitado. A abundância e a heterogeneidade das teorias mecanicistas disponíveis do envelhecimento sugerem que este fenômeno é excessivamente complexo e improvável de ser explicado por uma única via. Além disso, o envelhecimento permanece caracterizado por manifestações heterogêneas, não apenas na determinação de variações interindividuais, mas também nas diversidades sociais (Cesari et al., 2013).

O envelhecimento é um processo normal que ocorre em todos os organismos vivos. A divisão celular e a fosforilação oxidativa, processos fundamentais na sobrevivência celular, tornam-se alteradas com o envelhecimento. Portanto, o envelhecimento pode estar relacionado com a geração aumentada de espécies reativas geradas pela

cadeia respiratória desempenhando papel central no processo do envelhecimento normal. Além disso, o avanço da idade está relacionado com a redução da atividade do sistema de defesa antioxidante (Perluigi et al., 2014). Adicionalmente, o envelhecimento envolve disfunção na transmissão neuronal, por ocorrer alterações significativas na expressão e distribuição de neurotransmissores, tais como acetilcolina, serotonina, dopamina e glutamato (Morrison e Hof, 1997; Dickstein et al., 2013). Portanto, o envelhecimento envolve um complexo cenário de alterações que incluem disfunção mitocondrial, resposta ao estresse comprometida, rearranjo sináptico e alterações na expressão de proteínas (Kovacs et al., 2014).

Acredita-se que, dentre os processos fisiopatológicos, o estresse oxidativo exerça um papel desencadeador de doenças ou transtornos associados ao envelhecimento, como a doença de Alzheimer (DA) e acidente vascular cerebral (Burk et al., 2006). Estudos em modelos animais da DA mostram que as alterações moleculares precoces que induzem perda acelerada de neurônios incluem o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequente ativação de vias apoptóticas (Aliaghaei et al., 2014).

O envelhecimento é um processo cumulativo de danos sofridos pelo organismo ao longo do tempo que levariam a uma consequente falha nos circuitos neuronais e/ou periféricos, resultando em mortalidade, bem como doenças relacionadas à idade (Ames et al., 1993; Huang et al., 2012).

1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA foi descrita primeiramente em 1907 por Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907; Kidd, 1963; Selkoe, 2001), através de observações de análises histológicas em cérebro de uma paciente post mortem. A DA é uma doença neurodegenerativa, caracterizada por perda progressiva de memória e diminuição de funções cognitivas em um processo associado com a perda de neurônios e perda sináptica, com consequente respostas inflamatórias e anormalidades mitocondriais (Reddy e Beal, 2008). Está relacionada à idade e é uma das formas mais comuns de demência (Ismail et al., 2011).

A prevalência da doença aumenta com a idade (1-2% aos 65 anos e 35% ou mais após os 85 anos). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 35,6 milhões de pessoas apresentam demência, com expectativa de vida de 5 a 8 anos. Este número deve dobrar até 2030 (65,7 milhões) e mais do que triplicar até 2050 (115,4 milhões) (Cumming e Brodtmann, 2010; OMS, 2012). No Brasil, existem poucos estudos com relação à incidência e à prevalência desta doença. Um estudo realizado no Rio Grande do Sul mostrou uma taxa de incidência de 14,8 por 1.000 pessoas (Herrera et al., 2002). Outro estudo realizado no estado de São Paulo mostrou uma incidência de 7,7 por 1.000 pessoas por ano (Chaves et al., 2009). Além de ser considerada uma doença incapacitante, os cuidados de saúde em longo prazo desses pacientes estão associados a altos custos financeiros (Wimo et al., 2013).

Dentre as principais características fisiopatológicas da DA, encontram-se perda sináptica, aumento de placas senis constituídas de peptídeo β -amiloide ($A\beta$) 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). 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 β -amiloides e os emaranhados neurofibrilares sejam as principais características desta doença, acompanhadas por uma marcante atrofia e perda de neurônios cerebrais (Nimmrich e Ebert, 2009).

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. As enzimas β e γ -secretases participam da via amiloidogênica (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 (Danysz e Parsons, 2012). O acúmulo destes peptídeos β -amiloides induz neurotoxicidade e acredita-se que este seja um fator fisiopatológico crucial para o desenvolvimento da DA. 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 cinases e fosfatases 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

prosencefalo 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 não é efetiva, 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 (IACHe) e antagonistas de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Bond et al., 2012). Dentre os IACHe, encontram-se donapezil, rivastigmina e galantamina, primeira linha de fármacos utilizados para tratar a DA leve a moderada. Donapezil pode ser utilizado também para o tratamento da DA grave (Birks, 2006; Chu, 2012; Sadowsky e Galvin, 2012).

1.3 MEMÓRIA, ENVELHECIMENTO E DA

A memória é influenciada por diferentes condições fisiológicas. As habilidades cognitivas são mediadas por circuitos do hipocampo e do neocórtex, extremamente vulneráveis ao envelhecimento cerebral. Durante a senescência, a memória é uma das principais funções prejudicadas. Entretanto, os mecanismos envolvidos no declínio cognitivo ainda não são bem entendidos (Morrison e Hof, 1997; Hof e Morrison, 2004).

A DA é acompanhada pela demência resultante da desconexão dos circuitos corticais associadas a morte neuronal e perda sináptica. Nesta doença, há uma vulnerabilidade seletiva, em que a degeneração de neurônios culmina em demência (Donohue et al., 2014; Koch et al., 2014; Spires-Jones e Hyman, 2014)

No envelhecimento, o indivíduo apresenta um declínio do estado cognitivo observado por déficits de memória e capacidade para uso estratégico da informação adquirida. Estudos em animais sugerem que tanto a DA, quanto o comprometimento cognitivo, estão associados à senescência e compartilham destes mesmos danos (Disterhoft e Oh, 2006; Wang et al., 2012). Contudo, a morte neuronal é predominante e maciça na DA, enquanto que, no envelhecimento, são predominantes alterações sinápticas em circuitos intactos. Tais alterações sinápticas relacionadas com a idade podem ser reversíveis, enquanto que as alterações observadas na DA não podem sofrer remissão com os fármacos disponíveis no mercado (Hof e Morrison, 2004; Disterhoft e Oh, 2006). É importante ressaltar que, durante o 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, angústia emocional e sintomas comportamentais (Galvin e Sadowsky, 2012; Möller et al., 2013).

É um consenso o fato de que o envelhecimento e a neurodegeneração induzem prejuízo no processamento neural das informações (Hong e Rebec, 2012). Uma explicação para isso pode ser o surgimento, com o avançar da idade, do aumento nos ruídos neurais (rotas diferentes de sinapses), induzindo a ocorrência de uma atividade neuronal aleatória, sendo muito mais acentuada na DA (Li et al., 2001; Li e Sikström, 2002; Macdonald et al., 2012). Este mecanismo poderia ser mediado, ao menos em parte, por uma interação entre a dopamina e o glutamato (Hong e Rebec, 2012)

É conhecido que, em roedores, macacos e humanos, a memória normal para fatos e eventos da vida requer a função de um grupo de estruturas interconectadas no lobo temporal medial, incluindo o hipocampo e regiões para-hipocampais (El-Mallakn et al., 1995). Apesar de existirem diferenças neurobiológicas entre as espécies, os princípios funcionais e organizacionais que governam o sistema de memória são similares em ratos e humanos. Desta forma, a utilização de modelos animais para pesquisar o envelhecimento e doenças relacionadas à idade é fundamental para o estudo da memória (Gallagher et al., 2011).

Muitos estudos observam um envelhecimento bem sucedido, no qual o indivíduo possa envelhecer com boa capacidade física, cognitiva e baixa probabilidade de desenvolver doenças

associadas à idade, como a DA (Gallagher et al., 2011). Modelos animais estão sendo desenvolvidos para estudar o envelhecimento e doenças associadas a este, para entender como aumentar a expectativa de vida e a qualidade de vida durante o envelhecimento.

1.4 D-GALACTOSE

A D-galactose (D-gal) é um monossacarídeo redutor menos solúvel do que a glicose, com menor poder adoçante do que a glicose, além de ser fundamental na formação da lactose do leite materno por um processo relativamente simples. Também é constituinte de glicolipídios, proteoglicanos e glicoproteínas (Lei et al., 2008). O metabolismo da D-gal é descrito em etapas pela via de Leloir, que recebe esse nome em homenagem a Luis Frederico de Leloir, que investigou as glicoproteínas no leite, ganhando o prêmio Nobel de química (Danysz e Parsons, 2012). Essas etapas são fundamentais para o estudo da galactosemia, um erro inato do metabolismo, caracterizado pela incapacidade de converter a D-gal em glicose por deficiência em uma das enzimas do seu metabolismo (Danysz e Parsons, 2012).

A hidrólise da lactose por uma galactosidase, a lactase, nas microvilosidades intestinais, leva à formação de glicose e D-gal (Segal et al., 1995). No fígado, a D-gal é rapidamente metabolizada a glicose-1-fosfato pela ação de quatro enzimas que constituem a via de Leloir: galactose mutarrotase (GALM – EC 5.1.3.3), galactocinase (GALK – EC 2.7.1.6), galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT – EC 2.7.7.12) e galactose-4-epimerase (GALE – EC 5.1.3.2) (Holden et al., 2003). A

sequência de reações catalisadas pelas enzimas GALT, GALK e GALE pode ser observada na figura 1.

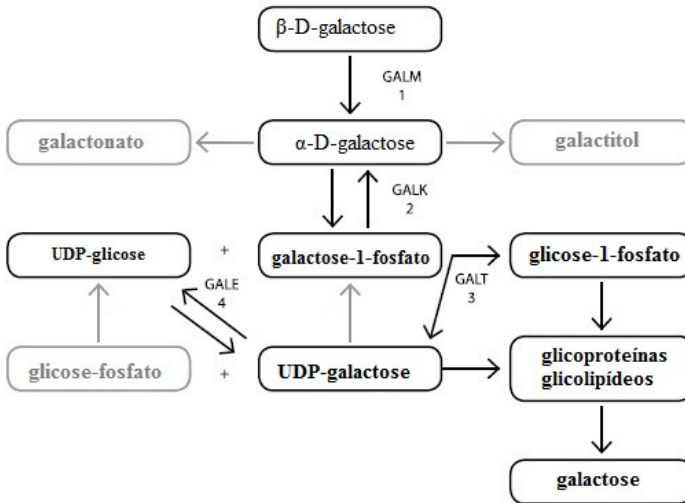


Figura 1: Metabolismo da galactose responsável pela interconversão da galactose em glicose na via de Leloir e vias acessórias. Primeiramente, a galactose é rapidamente metabolizada a glicose-1-fosfato pela ação de quatro enzimas que constituem a via de Leloir: galactose mutarrotase (GALM-1), galactocinase (GALK-2), galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT-3) e UDP galactose-4-epimerase (GALE-4). A glicose-1-fosfato entra na via glicolítica e é transformada em glicose rapidamente. Cerca de 80% da galactose é metabolizada à glicose no fígado (Gitzelmann, 2000; Silva e Cardoso 2008).

Quando há uma incapacidade em metabolizar a galactose por atividade diminuída de GALK, GALT ou GALE, duas vias alternativas são ativadas. A galactose pode ser reduzida a galactitol, por intermédio da aldose redutase, ou oxidada a galactonato, por intermédio da galactonato oxidase. O galactonato pode ser, posteriormente, oxidado a

co2 e xilose (Gitzelmann, 2000; Silva e Cardoso, 2008). Tanto o excesso de galactitol quanto o de galactonato levam à geração excessiva de ERO, causando dano neuronal e morte celular por apoptose (Hsieh et al., 2009; Yang et al., 2013).

1.4.1 D-galactose, envelhecimento e DA

A D-gal é um açúcar redutor que, em concentrações elevadas, reage com os grupos amino de proteínas e peptídeos para formar produtos finais de glicação avançada, resultando na geração de ERO (Munch et al., 2012). Foi postulado que o acúmulo de D-gal induz alterações comportamentais que reproduzem o processo natural de envelhecimento em roedores (Cui et al., 2006; Hua et al., 2007; Hsieh et al., 2009; Kumar et al., 2009; Chen et al., 2010). Nos últimos 5 anos, mais de 400 trabalhos descreveram que a administração crônica sistêmica de d-gal pode mimetizar o envelhecimento natural em roedores, bem como doenças relacionadas à senescência, como a DA (de acordo com a base de dados pubmed).

Hua et al. (2007) demonstraram que a administração crônica de D-gal pode levar a alterações metabólicas, à formação excessiva de ERO, a danos neuronais e a um declínio na capacidade de aprendizagem e armazenamento da memória em ratos. Outros estudos mostraram que a aplicação de D-gal em ratos leva a déficits cognitivos e alterações importantes associados ao envelhecimento e à DA, como prejuízo do potencial antioxidante do cérebro, degeneração colinérgica, diminuição da plasticidade sináptica e um aumento de deposição em hipocampo e

córtex cerebral de placas senis formadas pelo acúmulo do A β (Hsieh et al., 2009; Liu et al., 2010).

Adicionalmente, Qin et al. (2012) mostraram que, em cérebro de ratos que envelheceram normalmente, há produção de proteína amiloide. Quando o envelhecimento foi induzido pela administração de D-gal (intraperitoneal; 48 mg/kg/dia) por 6 dias consecutivos, observou-se que o acúmulo de A β em cérebros de ratos aumentou significativamente, associado a um distúrbio da cognição espacial, sugerindo que este modelo apresenta boa reprodutibilidade. Outras alterações fisiopatológicas podem ser encontradas em animais submetidos à administração de D-gal, como redução da neurogênese e aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebro de ratos acompanhados por declínio cognitivo (Xian et al., 2011; Yang et al., 2013)

Barry et al. (2011) induziram a exposição sistêmica crônica de D-gal (100 mg/kg, subcutânea; durante 7 semanas), e observou prejuízo de memória espacial, aumento de cariopicoiose celular, apoptose via ativação da caspase-3, diminuição do número de novos neurônios na zona subgranular no giro denteado do hipocampo, com redução da migração de células progenitoras neurais, e aumento na morte de neurônios recém-formados na camada de células granulares. A exposição à D-gal também induziu estresse oxidativo periférico, incluindo aumento dos níveis de malondialdeído, diminuição da capacidade antioxidante total e da atividade das enzimas superóxido dismutase e glutatona peroxidase (Reddy et al., 2007; Yang et al., 2013). Portanto, a toxicidade induzida por D-gal em ratos pode ser um

modelo útil para estudar os mecanismos da neurodegeneração e a busca de agentes neuroprotetores.

1.5 FATORES NEUROTRÓFICOS

Os fatores neurotróficos são peptídeos secretados que agem como fatores de crescimento para o desenvolvimento fenotípico e manutenção de populações de células específicas em desenvolvimento no sistema nervoso adulto dos vertebrados (Siegel e Chauhan, 2000). Promovem sobrevivência, crescimento e diferenciação dos neurônios. Além disso, neurônios com deficiência dos fatores neurotróficos morrem por apoptose (Mattson et al., 2002).

Os fatores neurotróficos podem ser agrupados de acordo com suas famílias, relacionados entre si na sua estrutura e função. As famílias podem ser classificadas em 4 tipos: superfamília do fator de crescimento do nervo (NGF), família do fator neurotrófico derivado de células glia (GDNF), superfamília da neuroquina ou neuropoietina e superfamília do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Cada um destes fatores neurotróficos sinaliza através de receptores específicos. Os receptores da superfamília do NGF incluem o p75NTR e cinases do receptor de tropomiosina (trkA, trkB e trkC). A família do GDNF se liga a receptores que incluem um complexo receptor de tirosina (RET) e receptor do fator de crescimento (TFG) α 1-4. A superfamília das neuroquinas se ligam os receptores gp130 e receptor- β do fator inibidor de leucemia (LIFRP) (Siegel e Chauhan, 2000; Allen et al., 2013).

A superfamília do NGF, também conhecida como neurotrofinas, inclui o NGF, o BDNF, neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT-4/5) e neurotrofina-6 (NT-6). A família do GDNF inclui o GDNF e três membros estruturalmente relacionados, como a neurturina (NTN), a persefina (PSP) e a artemina (Art). A família das neuroquinas é constituída pelo fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator inibidor de leucemia (LIF), interleucina-6 (IL-6), cardiotrofina (CT-1) e oncostatina-M. E, finalmente, os fatores de crescimento não neuronal incluem o fator ácido de crescimento fibroblástico (FGF-1), fator básico de crescimento fibroblástico (FGF-2), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento tipo insulina (IGF) e proteína morfogenética do osso (BMP) (Siegel e Chauhan, 2000; Moris e Vega, 2003; Linker et al., 2009; Linher-melville e li, 2013). Dentre todos estes fatores, o foco do presente estudo encontra-se no BDNF, NGF e GDNF, os quais exercem seus efeitos não somente na sobrevivência celular, mas também em atividades como aprendizagem, memória e comportamento (Mattson et al., 2002; Allen et al., 2013).

É bem descrito na literatura que o BDNF, neurotrofina produzida pelos neurônios, desempenha um papel importante na sobrevivência, diferenciação e crescimento de neurônios centrais e periféricos durante o desenvolvimento e na vida adulta, através da ativação de seu receptor trkB e consequente ativação de vias de sinalização dependente deste (Sohrabji e Lewis, 2006). Também foi demonstrado que esta neurotrofina desempenha um papel importante na plasticidade sináptica, principalmente em hipocampo e córtex cerebral (Kang e Schuman, 1995; Korte et al., 1995; Mcallister et al., 1999; Sohrabji e Lewis, 2006). O BDNF suporta a sobrevivência e

manutenção de neurônios sensoriais, do gânglio da retina, neurônios colinérgicos, neurônios motores espinhais e alguns neurônios dopaminérgicos. A ativação ou desativação das vias de sinalização resultam em fortalecimento ou enfraquecimento das conexões entre os neurônios, resultando em aumento ou diminuição da formação de sinapses nos espinhos dendríticos e axônios colaterais (Spillantini et al., 2013). O potencial de longa duração é uma melhoria duradoura na transmissão do sinal entre dois neurônios, resultado de estímulos de forma síncrona, contribui para a plasticidade sináptica e a capacidade das sinapses químicas de mudar sua potência (Spillantini et al., 2013). Acredita-se que a memória é codificada por modificação da força sináptica, por isso o potencial de longa duração é amplamente considerado como um dos principais mecanismos celulares que está na base da aprendizagem e memória (Bliss e Collingridge, 1993; Cooke e Bliss, 2006). O BDNF apresenta um papel central no desencadeamento da síntese e consolidação de novas memórias (Allen et al., 2013).

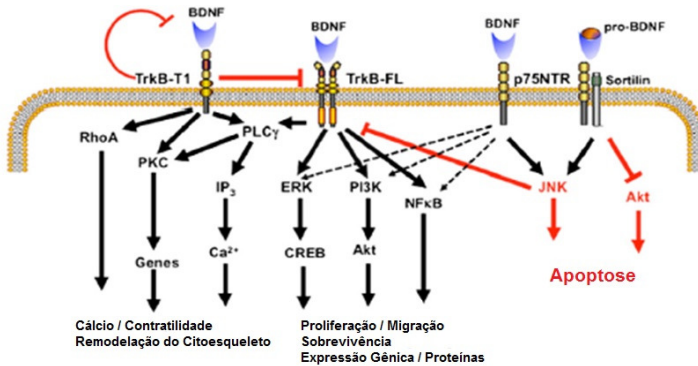


Figura 2: Esquema de sinalização da via do BDNF. A família neurotrofina consiste de quatro proteínas de polipeptídeos que ativam dois tipos de receptores. Todas as neurotrofinas (NGF, BDNF) ligam-se ao receptor p75NTR de baixa afinidade que não possui um domínio de tirosina-quinase, mas podem usar proteínas adaptadoras. Os receptores de afinidade elevada são as relacionadas com quinases tropomiosina (trks) que, no seu comprimento completo têm um domínio de tirosina-quinase intracelular através do qual eles funcionam (NGF trkA; BDNF trkB; GDNF trkC).

O NGF, o primeiro fator neurotrófico a ser descoberto, regula a sobrevivência, o desenvolvimento e o tropismo de populações neuronais específicas no sistema nervoso periférico e central (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968; Cirulli e Alleva, 2009). O NGF é produzido em córtex cerebral e hipocampo, que são alvos de neurônios de projeção colinérgica basal do prosencéfalo e desempenham papel importante na memória (Allen et al., 2013).

O GDNF é o fator neurotrófico derivado das células gliais, que é produzido e secretado por neurônios do estriado e desempenha um papel importante *in vivo* em manutenção e sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos no adulto, além disso, na glia (Lin et al., 1993; Hoffer et al., 1994; Tomac et al., 1995; Granholm et al., 2000; Boger et al., 2006; Pascual et al., 2008). Este fator neurotrófico é um potente

promotor da sobrevivência neuronal no sistema nervoso central e periférico, por ligar-se ao receptor Ret (Allen et al., 2013).

1.5.1 Fatores neurotróficos, envelhecimento e DA

No envelhecimento, a plasticidade neuronal é marcadamente reduzida (Burke e Barnes, 2006). Apesar de ocorrerem pequenas mudanças na morfologia hipocampal durante o envelhecimento, ocorre prejuízo no potencial de longa duração (Barnes, 1994; Pang e Lu, 2004; Rex et al., 2005). Além disso, na senescência, há prejuízo na memória espacial sem a perda evidente dos neurônios. Estas mudanças estão provavelmente associadas à redução nos níveis de BDNF (Gooney et al., 2004; Tapia-Arancibia et al., 2008). Adicionalmente, o envelhecimento pode estar relacionado à redução do transporte de NGF pelos neurônios colinérgicos, contribuindo para a disfunção, atrofia e vulnerabilidade neuronal (Niewiadomska et al., 2011). Contudo, pouco se sabe sobre o papel do GDNF no processo de envelhecimento, mas sabe-se de sua importância para a sobrevivência dos neurônios.

Em 1981, Stanley Appel sugeriu o envolvimento dos fatores neurotróficos no desencadeamento das doenças neurodegenerativas. Esta hipótese foi intitulada "uma hipótese unificadora para a causa da esclerose amiotrófica lateral, parkinsonismo e DA", sugerindo que cada um destes transtornos poderia ser causado por falta de uma "hormônio" ou um fator de crescimento, o qual seria normalmente secretado pelo tecido alvo dos neurônios afetados e transportado retrogradamente depois de ser captado pelo terminal pré-

sináptico. Na DA, estes fatores poderiam estar prejudicados principalmente nas regiões corticais e hipocampais (Appel, 1981).

BDNF e GDNF são importantes para a sobrevivência dos neurônios motores e dopaminérgicos. NGF e BDNF são também importantes para os neurônios colinérgicos e, além disso, BDNF é igualmente importante para a sobrevivência e função de neurônios hipocampais e corticais serotoninérgicos. Portanto, déficit em algum destes fatores neurotróficos pode não ser o gatilho inicial do processo da doença, porém pode induzir aumento na morte celular, resultando no aparecimento dos sintomas da DA (Hock et al., 2000; Holsinger et al., 2000; Allen et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração oral de D-gal sobre parâmetros de memória e níveis de neurotrofinas em cérebro de ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros de memória em esQUIVA inibitória em ratos submetidos à administração oral crônica de D-gal por 1, 2, 4, 6 e 8 semanas;
- Avaliar os níveis de BDNF, NGF e GDNF em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos à administração oral crônica de D-gal por 1, 2, 4, 6 e 8 semanas.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

O estudo foi executado dentro das diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal): Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA e Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos. Os experimentos foram iniciados somente após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo 033/2013-2).

Para este estudo, foram utilizados 100 ratos wistar machos, pesando de 250 g a 300 g, com 60 dias de vida, procedentes do biotério da instituição. Os animais foram acondicionados em 5 animais por caixa, com ciclo de claro e escuro de 12 horas (das 6 h às 18h) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido à temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. Os procedimentos de manipulação e os procedimentos comportamentais foram sempre realizados no período das 9h às 16h.

3.1.1 Administração de D-gal

No presente estudo, ratos wistar machos adultos receberam D-gal durante 1, 2, 4, 6 e 8 semanas, por via oral (*p.o.*). Através de gavagem, uma vez ao dia, na dose de 100 mg/kg. A dose foi baseada em estudos de lei (2008), Kumar et al. (2009), Prisila-Dulcy (2012) e Zhang et al.

(2014). A D-gal foi dissolvida em água mineral em um volume constante de 1 ml/kg de peso corporal do animal, não foi ajustado o pH.

Cada tratamento (1, 2, 4, 6 e 8 semanas) foi constituído de 2 grupos experimentais: controle (água) e de D-gal, com 10 animais em cada.

Ao final de cada semana, 24 horas após a última administração de D-gal ou água, os animais foram submetidos ao teste comportamental de esquiiva inibitória (figura 3).

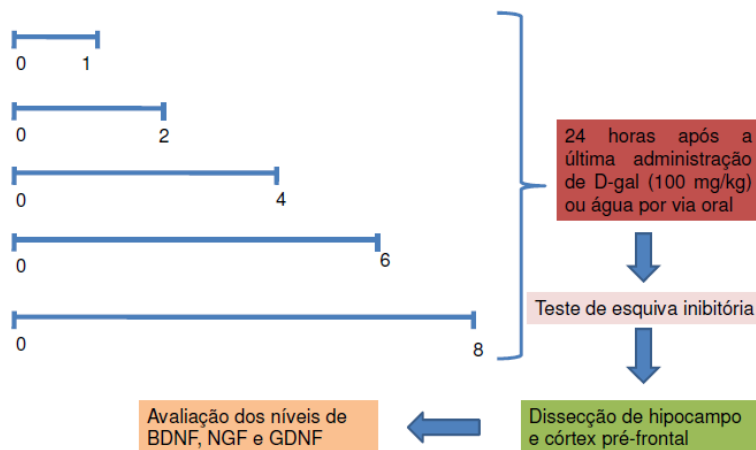


Figura 3: Protocolo esquemático do tratamento com D-galactose, por via oral durante 1, 2, 4, 6 e 8 semanas em ratos Wistar. Fonte: Do autor, 2014.

3.1.2 Esquiiva Inibitória

Consiste em uma caixa de acrílico cujo piso é formado por barras paralelas de metal. Uma plataforma foi colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e mediu-se o tempo que o animal levou para descer

com as quatro patas da plataforma (latência). Imediatamente após descer da plataforma, o animal recebeu um choque de 0,4 mA durante 2 segundos.

Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e foi medida a latência. Porém, não foi administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste serão de 5 segundos para avaliar memória imediata, 1,5 horas para avaliar memória de curta duração (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003) e 24 horas para avaliar memória de longa duração (Bevilaqua et al., 2003).

3.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE BDNF, NGF E GDNF

Após a avaliação comportamental de esQUIVA inibitória, os animais foram imediatamente decapitados na guilhotina e sem anestesia, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecados para realização das dosagens dos níveis dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF, através do teste de Elisa.

Os níveis corticais e hipocampais de BDNF, NGF e GDNF foram avaliados utilizando-se kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante (NGF e BDNF da Chemicon, EUA; GDNF da Biosensis, EUA). As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram revestidas durante 24 horas com as amostras diluídas 1:2 em diluente de amostra e a curva padrão variou entre 7,8 e 500 pg de BDNF ou NGF. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com diluentes das amostras. O anticorpo de coelho anti-BDNF monoclonal, um anticorpo monoclonal de coelho anti-NGF ou policlonal de rato anti-

GDNF diluídos 1:1000 em diluente da amostra foi incubado durante 3 horas à temperatura ambiente. Depois da lavagem, uma segunda incubação com o antianticorpo de coelho conjugado com peroxidase foi diluído 1:1000 e deixado durante 1 hora à temperatura ambiente. Após adição da enzima estreptavidina, substrato e stop solution, BDNF e NGF foram determinadas por leitura da absorvância a 450 nm em espectrofotômetro. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade ótica e as concentrações de BDNF, GDNF e NGF. A proteína total foi medida de acordo com Lowry e colaboradores (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos níveis de BDNF, NGF e GDNF foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Tukey, quando apropriado. Dados da tarefa de esquivar inibitória foram descritos como mediana \pm intervalo interquartil e as diferenças entre as sessões de teste e treino foram analisadas pelo teste de Wilcoxon. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. Valores de p foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os programas utilizados foram Statistical Package for the Social Science (SPSS) 20 e Statistica 7.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE COMPORTAMENTAL

A Figura 4 mostra a avaliação da memória aversiva através da tarefa de esquiva inibitória. Nessa tarefa, os ratos do grupo controle (administrados com água mineral por via oral) em todos os protocolos de tratamento (1, 2, 4, 6 e 8 semanas de tratamento) exibiram aumento da latência para a descida da plataforma quando expostos à sessão teste (após a sessão treino em que o rato recebeu um choque) para avaliar a memória imediata (MI; sessão teste 5 s após sessão treino), memória de curta duração (MCD; sessão teste 1,5 h após sessão treino) e memória de longa duração (MLD; sessão teste 24 h após sessão treino). Portanto, os ratos do grupo controle aprenderam que o choque é aversivo na memória imediata, de curta e de longa duração. A administração de D-gal durante 1 (A), 2 (B), 6 (D) e 8 (E) semanas de tratamento produziu o mesmo padrão de resposta exibida pelos ratos do grupo controle. É importante ressaltar que não houve diferenças significativas entre os grupos (controle e ratos tratados com D-gal) na sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória em nenhum dos protocolos experimentais.

Dados estatísticos da latência para a descida da plataforma na tarefa de esquiva inibitória mostraram diferenças significativas entre as sessões treino e teste analisados pelo teste de Wilcoxon em cada grupo controle em 1 semana (MLD: $p < 0,012$), 2 semanas (MI: $p < 0,01$; MCD: $p < 0,01$; MLD: $p < 0,01$), 4 semanas (MI: $p < 0,01$; MLD: $p < 0,01$), 6 semanas (MI: $p < 0,01$; MCD $p < 0,01$) e 8 semanas (MI: $p < 0,01$; MCD: $p < 0,02$; MLD: $p < 0,01$) e em cada semana de tratamento com D-gal, 1

semana (MI: $p < 0,01$, MCT: $p < 0,01$, MLD: $p < 0,01$), 2 semanas (MI: $p < 0,01$; MCD: $p < 0,01$; MLD: $p < 0,01$), 6 semanas (MCD: $p < 0,01$) e 8 semanas (MI: $p < 0,01$; MCD: $p < 0,01$; MLD: $p < 0,01$) de tratamento. Porém, o teste Mann-Whitney mostrou uma diferença significativa no tratamento que teve duração de 4 (C) semanas no grupo D-gal em relação ao grupo controle nas sessões teste (MI: $p < 0,01$; MCD: $p < 0,02$; MLD: $p < 0,001$), indicando redução do aprendizado nos animais que foram tratados durante 4 semanas com D-gal por via oral.

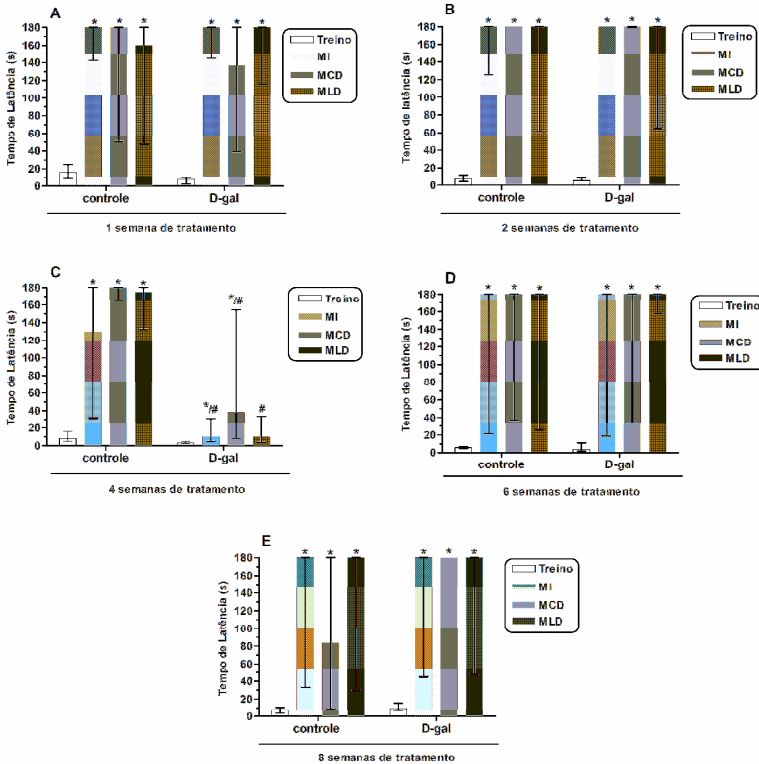


Figura 4. Efeito da administração Crônica de D-galactose (D-gal) durante 1(A), 2(B), 4(C), 6(D) e 8(E) semanas de tratamento por via oral sobre memória aversiva avaliada através da tarefa de esquila inibitória. Dados de latência para a descida da plataforma pelos animais na esquila inibitória são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil na sessão treino e nas sessões teste. Memória imediata (MI), memória de curta duração (MCD) e memória de longa duração (MLD), $n=10$ ratos por grupo experimental. * $p < 0,05$ quando comparado dentro de cada grupo (controle, administrado com água mineral por *p.o.* ou D-gal) em relação à sessão treino. # $p < 0,05$ quando comparado entre os grupos.

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os níveis de BDNF em córtex pré-frontal e hipocampo de animais que receberam administração crônica de D-gal são mostrados na Figura 5A e 5B. Na figura 4A, pode-se observar um aumento dos níveis de BDNF em hipocampo dos animais submetidos ao tratamento crônico com D-gal por 1 semana ($p < 0,001$) e 2 semanas ($p < 0,01$). Da mesma forma, na figura 4B, houve um aumento dos níveis desta neurotrofina em córtex pré-frontal de animais que receberam administração crônica de D-gal por 1 e 2 semanas, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$, $p < 0,001$ respectivamente). Por outro lado, nos tratamentos de 4, 6 e 8, foi verificada uma redução dos níveis de BDNF nesta mesma estrutura cerebral ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$ respectivamente).

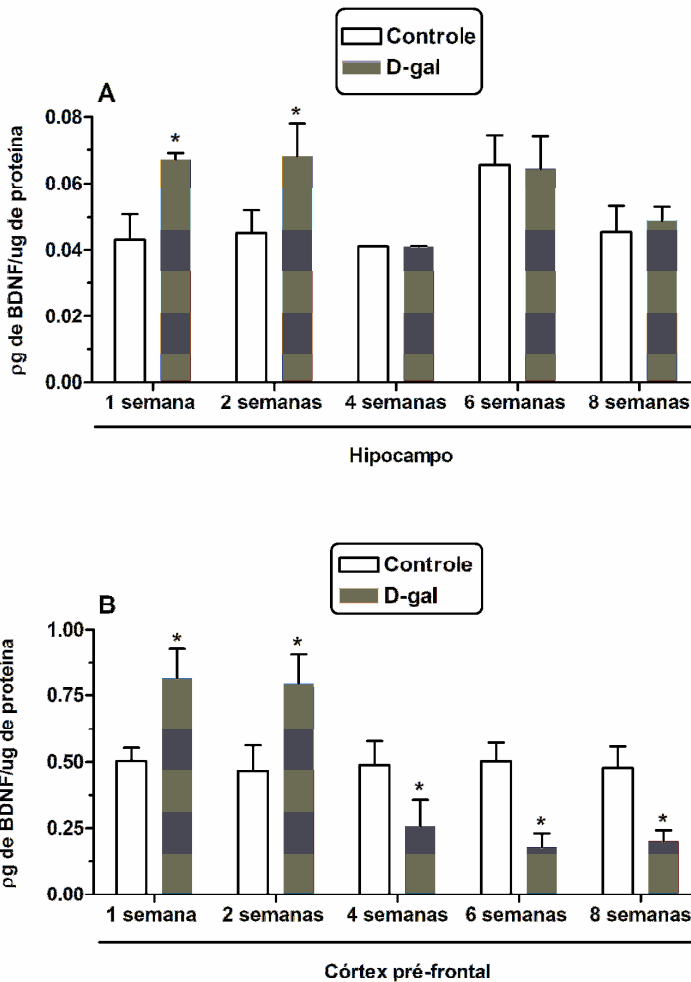


Figura 5: Efeito da administração Crônica de D-galactose (D-gal) durante 1(A), 2(B), 4(C), 6(D) e 8(E) semanas de tratamento por via oral sobre os níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos Wistar. Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos por grupo experimental. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Os resultados ilustrados na Figura 6 mostram os níveis de NGF em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos Wistar. Foi observado um aumento dos níveis de NGF em hipocampo após 1 semana ($p < 0,001$) e 2 semanas ($p < 0,01$) de tratamento com D-gal. Porém, não houve diferença significativas nos níveis de NGF após 4, 6 e 8 semanas de tratamento, permanecendo estes níveis semelhante ao grupo controle. Na figura 6B, pode-se observar que os níveis de NGF em córtex pré-frontal estão aumentados após 1 e 2 semanas ($p < 0,001$; $p < 0,001$, respectivamente), de tratamento com D-gal. Após 4 semanas de tratamento, não houve diferença significativa entre os grupos. No entanto, após 6 e 8 semanas ($p < 0,001$; $p < 0,001$ respectivamente) houve uma redução nos níveis desta neurotrofina após tratamento com D-gal.

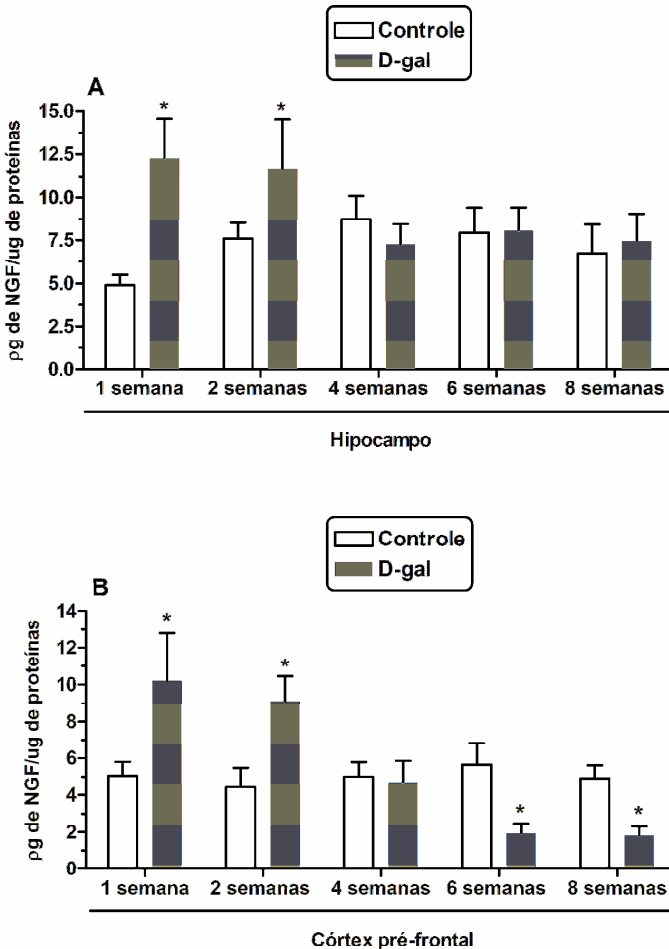


Figura 6: Efeito da administração Crônica de D-galactose (D-gal) durante 1(A), 2(B), 4(C), 6(D) e 8(E) semanas de tratamento por via oral sobre os níveis do fator de crescimento neural (NGF) em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos Wistar. Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos por grupo experimental. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

A figura 7 mostra os níveis de GDNF após o tratamento com D-gal por 1, 2, 4, 6 e 8 semanas em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos. Após 1 semana de tratamento com D-gal, foi observado um aumento dos níveis de GDNF ($p < 0,01$) e uma redução após 8 semanas de tratamento ($p < 0,001$) em hipocampo. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e D-gal após 2, 4 e 6 semanas de tratamento. Em córtex pré-frontal, observou-se que, após 4, 6 e 8 semanas de tratamento com D-gal, houve uma diminuição significativa nos níveis de GDNF ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, respectivamente).

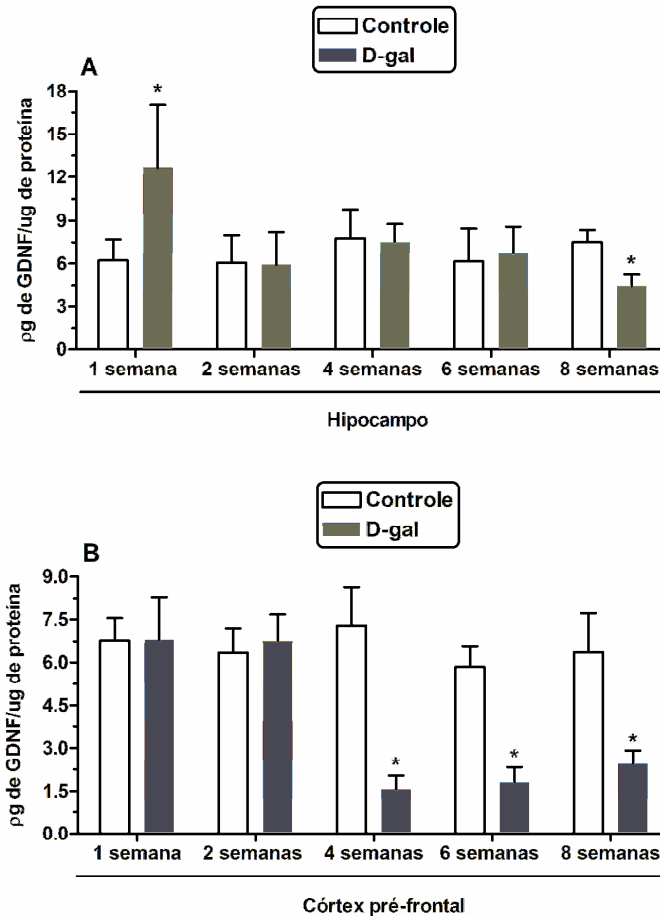


Figura 7: Efeito da administração Crônica de D-galactose (D-gal) durante 1(A), 2(B), 4(C), 6(D) ou 8(E) semanas de tratamento por via oral sobre os níveis do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos Wistar. Dados são apresentados como média \pm erro padrão da média, $n=10$ ratos por grupo experimental. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

5 DISCUSSÃO

A D-gal é um açúcar redutor cuja administração crônica por via intraperitoneal ou subcutânea induz déficit de aprendizado e memória, sendo um modelo de envelhecimento amplamente utilizado em ratos e camundongos (Wei et al., 2005; Chen et al., 2010; Prisila-Dulcy et al., 2012). Além disso, a administração de D-gal por via intraperitoneal induz déficit cognitivo e alterações bioquímicas em ratos e camundongos semelhantes as encontradas em DA (Cui et al., 2006; Hua et al., 2007; Li et al., 2012; Zhang et al., 2012). Entretanto, estudos mostrando a indução de um modelo de envelhecimento ou modelo experimental de DA pela administração oral de D-gal, são escassos. Salkovic-Petrisic et al. (2014) mostraram que a administração de D-gal por via oral (200 mg/kg, administrada por 30 dias através da água de beber a ratos Wistar machos) não induziu déficit cognitivo em ratos.

Os resultados do presente trabalho indicaram que a administração oral de D-gal (100 mg/kg 1 vez ao dia) induziu déficit cognitivo após 4 semanas de tratamento. Contudo, estes resultados não mostram alterações cognitivas após 6 e 8 semanas de tratamento como observados quando administrada por via intraperitoneal ou subcutânea (Prisila-Dulcy et al., 2012; Zhang et al., 2012). A esQUIVA inibitória, apesar de avaliar a memória aversiva, ou seja, o déficit de aprendizado do animal, proporciona um bom indício de alteração de parâmetros cognitivos (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003).

O déficit de memória é a principal alteração observada em doenças relacionadas à idade, como a DA. Estas alterações são observadas em modelos animais da DA, bem como em modelos de

envelhecimento (Willis et al., 2009; Romberg et al., 2013). De acordo com estudos realizados por Chen (2000), a administração aguda de peptídeo A β 1-42, um modelo animal de DA, inibiu fortemente o potencial de longa duração, com conseqüente perda da plasticidade sináptica em hipocampo. Estudos têm demonstrado que a administração crônica de D-gal leva a um comprometimento cognitivo, com perda de memória associada à formação de placas A β (Prisila-Dulcy et al., 2012).

A disfunção cognitiva induzida pela administração crônica (20 semanas) de D-gal foi também observada utilizando-se o teste de labirinto aquático de Morris e Y-maze (Zhang et al., 2012). Estudos têm demonstrado uma forte relação entre déficit cognitivo e dano neuronal na DA. Tal fato pode levar à hipótese de que o modelo animal induzido pela administração de D-gal pode mimetizar o envelhecimento e a DA.

O déficit cognitivo está relacionado com os níveis de fatores neurotróficos em estruturas cerebrais como o córtex pré-frontal e o hipocampo no envelhecimento (Tapia-Arancibia et al., 2008; Niewiadomska et al., 2011), principalmente na DA (Hock et al., 2000; Allen et al., 2013). Considerando este fato, o presente estudo avaliou os níveis de fatores neurotróficos em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos à administração crônica de D-gal durante 1, 2, 4, 6 e 8 semanas.

Após a primeira e segunda semana de administração de D-gal, houve aumento dos níveis de BDNF em hipocampo e córtex pré-frontal. Em hipocampo, após 4, 6 e 8 semanas de tratamento com D-gal, houve redução destes níveis. De acordo com estudos realizados por Chen et al. (2010), a redução dos níveis de BDNF também foi encontrada no tecido cerebral post-mortem de pacientes com DA. Os autores sugerem que

esta diminuição do BDNF pode estar relacionada com o dano cognitivo. Por outro lado, Allen et al. (2013) encontraram níveis elevados de BDNF em líquido de pacientes com DA, em comparação com o grupo controle. As mesmas observações foram realizadas por Donohue et al. (2014). No processo de envelhecimento, sem associação de doenças, também foi encontrada uma redução nos níveis desta neurotrofina (Gooney et al., 2004; Tapia-Arancibia et al., 2008). Um estudo sugeriu que a administração de BDNF nas fases iniciais da doença reverteu a perda sináptica e melhorou a memória e a aprendizagem e que em animais velhos, a aplicação do BDNF reverteu o declínio cognitivo. (Nimmrich et al., 2009).

Contudo, os estudos sobre a relação do envelhecimento e DA com BDNF são ainda contraditórios. Neste cenário, os resultados do presente trabalho sugerem que o aumento dos níveis de BDNF após as primeiras semanas de tratamento com D-gal podem estar relacionados ao envelhecimento normal e com as fases iniciais da DA, com consequente perda de memória leve, podendo esta não ser detectada nos testes comportamentais observados, ou mesmo uma fase inicial sem o comprometimento cognitivo. No entanto, não podemos descartar um efeito protetor da D-gal durante períodos curtos de tratamento (1 ou 2 semanas). Neste sentido Salkovic-Petrisic et al. (2014) demonstraram um efeito protetor da D-gal contra as alterações cognitivas induzidas pela estreptozotocina. Entretanto, a redução dos níveis de BDNF em córtex pré-frontal após 4 semanas de tratamento com D-gal pode ser um grande indicativo de que este modelo de administração de D-gal durante 4 semanas pode reproduzir mudanças semelhantes ao envelhecimento e/ou à DA.

Os níveis de NGF, no presente estudo, encontraram-se aumentados nas 2 primeiras semanas de tratamento com D-gal tanto em hipocampo quanto em córtex pré-frontal. Além disso, em hipocampo, após 6 e 8 semanas de tratamento com D-gal, houve redução dos níveis dessa neurotrofina. Hua et al. (2007) encontraram níveis aumentados de NGF em cérebro de pacientes acometidos por DA. Outro estudo mostrou que a administração intranasal de NGF atenuou significativamente depósitos do A β 1-42, exercendo efeito protetor na célula neuronal, preservando o hipocampo e as conexões sinápticas corticais (Tian et al., 2012). Também foi observado que uma administração por via intranasal de NGF em camundongos transgênicos para a DA impediu o progresso da neurodegeneração e os déficits comportamentais (Donohue et al., 2014).

Em cérebro post-mortem de pacientes com DA, encontrou-se um aumento dos níveis de NGF em hipocampo e em córtex frontal. Tais achados sugerem que as diferenças nos níveis de NGF no cérebro de pacientes com DA se deve a uma redução na captação desta neurotrofina por regiões cerebrais específicas, redução do transporte retrógrado desta neurotrofina ou uma menor afinidade na ligação com o receptor Trk (Hock, 2000). Porém, um estudo mais recente em animais transgênicos para a DA mostrou que a administração de NGF diminuiu o acúmulo de A β 1-40 e A β 1-42 (Yang et al., 2014). Os resultados do presente estudo sugerem que o aumento nos níveis de NGF nas primeiras semanas de tratamento com D-gal poderia ser um início do processo de neurodegeneração, considerando-se este modelo como um possível candidato para induzir alterações tipo DA, mas estudos adicionais necessitam ser realizados para confirmar esta hipótese.

O envelhecimento também está relacionado com a redução do transporte retrógrado do NGF, ou seja, sua capacidade de ser captado das terminações neuronais e retroceder para o corpo celular (Niewiadomska et al., 2011). Após 6 e 8 semanas de administração de D-gal, houve redução dos níveis de NGF em córtex pré-frontal, indicando uma disfunção. Entretanto, não foi observada esta disfunção no teste comportamental, o que reforça a ideia de que outros testes comportamentais devem ser realizados para avaliar outros tipos de memória. Após 4 semanas de administração de D-gal, observou-se nenhuma alteração nos níveis de NGF em nenhuma estrutura avaliada. Os resultados deste estudo também mostraram que a administração crônica de D-gal induziu um aumento dos níveis de GDNF em hipocampo após 1 semana de tratamento. Por outro lado, nesta mesma estrutura, o tratamento com D-gal por 8 semanas induziu uma diminuição dos níveis deste fator neurotrófico. Além disso, em córtex pré-frontal, após 4, 6 e 8 semanas de tratamento com D-gal houve redução destes níveis. O GDNF é um potente agente de sobrevivência para os neurônios dopaminérgicos, sendo retrogradamente transportado para os corpos celulares após sua injeção no corpo estriado, e, quando isto ocorre, aumentam em tamanho e formam uma densa rede de comunicação de dendritos e axônios, quando comparados com neurônios não dopaminérgicos (Allen et al., 2013). Pouco se sabe sobre o papel deste fator neurotrófico no envelhecimento. Porém, as concentrações líquóricas de GDNF em pacientes com DA são significativamente aumentadas (Li et al., 2012). De acordo com os autores, o aumento dos níveis de GDNF pode ocorrer nas fases iniciais da doença, na tentativa de proteger o sistema nervoso central (Li et al.,

2012). Por outro lado, a diminuição da concentração de GDNF pode-se dever à redução da permeabilidade da barreira hematoencefálica a mediadores inflamatórios ao sistema nervoso central (Straten et al., 2011). Portanto, o resultado após a quarta semana de tratamento com D-gal, em que houve redução dos níveis de GDNF em córtex pré-frontal, pode estar relacionado ao déficit cognitivo observado através do teste de esQUIVA inibitória.

Vale ressaltar que a redução dos níveis de BDNF e GDNF no córtex pré-frontal, após 4 semanas de tratamento com D-gal, pode ser um grande indicativo de que este modelo de administração de D-gal durante 4 semanas pode reproduzir alterações semelhantes ao envelhecimento e/ou DA, visto que induziu déficit cognitivo. Porém, este déficit pode ser mediado por outro mecanismo bioquímico e não somente pela redução destes fatores neurotróficos, uma vez que as administrações de D-gal por 6 e 8 semanas desencadeou uma redução dos níveis de BDNF, NGF e GDNF em córtex pré-frontal. Porém, não foi observado déficit cognitivo no teste de esQUIVA inibitória nestes períodos. Considerando que esta estrutura é extremamente importante para o processamento da memória (Pollard, 2014), pode-se inferir que este teste em que os animais foram submetidos não foi sensível para o dano cognitivo, como observado após 4 semanas de tratamento com D-gal. Neste sentido, outros testes comportamentais necessitam ser realizados para validar este modelo de DA.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que a administração oral de D-gal pode causar comprometimento cognitivo e diminuição dos níveis de BDNF, GDNF e NGF em córtex pré-frontal de ratos. Contudo, estudos adicionais são necessários para compreender o dano cognitivo e as alterações dos níveis de neurotrofinas induzidos pela administração de D-gal.

REFERÊNCIAS

Aliaghaei A, Khodagholi F, Ahmadiani A. Conditioned media of choroid plexus epithelial cells induces NRF2-activated phase II antioxidant response proteins and suppresses oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Mol Neurosci*. 2014; 53:617-25.

Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther*. 2013; 138:155-75.

Alzheimer A. Über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. *Centralblatt Fur Nervenheilkunde Psychiatrie*. 1907; 30:177-79.

Ames BN, Shigenaga MK, Gold LS. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 1993; 101:35-44.

Appel, SH. A unifying hypothesis for the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism, and Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 1981; 10:499–505.

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

Barnes CA. Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 1994; 17:13-8.

Barry AE, Klyubin I, Mc Donald JM, Mably AJ, Farrell MA, Scott M, Walsh DM, Rowan MJ. Alzheimer's disease brain-derived amyloid- β -mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *J Neurosci.* 2011; 31:7259-63.

Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci.* 2003; 17:897-902.

Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 1:CD005593.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993; 361:31-9.

Boger HA, Middaugh LD, Huang P, Zaman V, Smith AC, Hoffer BJ, Tomac AC, Granholm AC. A partial GDNF depletion leads to earlier age-related deterioration of motor function and tyrosine hydroxylase expression in the substantianigra. *Exp Neurol.* 2006; 202:336-47.

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.

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

Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7:30-40.

Cesari M, Vellas B, Gambassi G. The stress of aging. *Exp Gerontol.* 2013; 48:451-6.

Chaves ML, Camozzato AL, Godinho C. Incidence of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease in Southern Brazil. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2009; 22:181-7.

Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y, Xie CW. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *J Neurosci Res.* 2000; 60:65-72.

Chen B, Zhong Y, Peng W, Sun Y, Kong WJ. Age-related changes in the central auditory system: comparison of D-galactose-induced aging rats and naturally aging rats. *Brain Res.* 2010; 1344:43-53.

Chu LW. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J*. 2012; 18:228-37.

Cirulli F, Alleva E. The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Front Neuroendocrinol*. 2009; 30:379-95.

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

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

Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain*. 2006; 129:1659–73.

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

Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long J, Packer L, Liu J. Chronic Systemic D-galactose Exposure Induces Memory Loss, Neurodegeneration, and Oxidative Damage in Mice: Protective Effects of R- α -Lipoic Acid. *J Neurosci Res*. 2006; 84:647–54.

Cumming T, Brodtmann A. Dementia and stroke: The present and future epidemic. *Int J Stroke*. 2010; 5:453-54.

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.

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.

Dickstein DP, Pescosolido MF, Reidy BL, Galvan T, Kim KL, Seymour KE, Laird AR, Di Martino A, Barrett RP. Developmental meta-analysis of the functional neural correlates of autism spectrum disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2013; 52:279-89.

Disterhoft JF, Oh MM. Pharmacological and molecular enhancement of learning in aging and Alzheimer's disease. *J Physiol Paris*. 2006; 99:180-92.

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; (In Press)

El-Mallakh RS, Harrison LT, Li R, Changaris DG, Levy RS. An animal model for mania: preliminary results. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1995; 19:955-62.

Gallagher M, Stocker AM, Koh MT. Mindspan: lessons from rat models of neurocognitive aging. *ILAR J*. 2011; 52:32–40

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

Gitzelmann R. Disorders of Galactose Metabolism. *Inborn Metabolic Diseases*. 2000; 5:102-9.

Goedert M, Klug A, Crowther RA. Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2006; 9:195-7.

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

Gooney M, Messaoudi E, Maher FO, Bramham CR, Lynch MA. BDNF-induced LTP in dentate gyrus is impaired with age: analysis of changes in cell signaling events. *Neurobiol Aging*. 2004; 25:1323-31.

Granholt AC, Reyland M, Albeck D, Sanders L, Gerhardt G, Hoernig G, Shen L, Westphal H, Holfer B. Glial cell line-derived neurotrophic factor is essential for postnatal survival of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*. 2000; 20:3182-90.

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.

Hartman C, Berkowitz D, Weiss B, Shaoul R, Levine A, Adiv OE, Shapira R, Fradkin A, Wilschanski M, Tamir A, Shamir R. Nutritional supplementation with polymeric diet enriched with transforming growth factor-beta 2 for children with Crohn's disease. *Isr Med Assoc J.* 2008; 10:503-7.

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

Herrera E Jr, Caramelli P, Silveira AS. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2002; 16:103-8.

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.

Hof PR, Morrison JH. The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci.* 2004; 27:607-13.

Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huetti P, Hudson J, Martin D, Lin LF, Gerhardt GA. Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci.* 1994; 182:107-11.

Holden HM, Rayment I, Thoden JB. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem.* 2003; 278:43885-8

Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnestock M. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000; 76:347-54.

Hong SL, Rebec GV. Biological sources of inflexibility in brain and behavior with aging and neurodegenerative diseases. *Front Syst Neurosci.* 2012; 30:6-77

Hsieh H, Wua W, Hu M. Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47:625-32.

Hua X, Lei M, Zhang Y, Ding J, Han Q, Hu H, Xiao M. Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. *Life Sci.* 2007; 80:1897-905.

Huang T, Fang F, Chen L, Zhu Y, Zhang J, Chen X, Yan SS. Ginsenoside Rg1 attenuates oligomeric A β (1-42)-induced mitochondrial dysfunction. *Curr Alzheimer Res.* 2012; 9:388-95.

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.

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

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 1998; 393:635-6.

Kang H, Schuman EM. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Sci.* 1995; 267:1658-62.

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

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.

Koch K, Myers NE, Göttler J, Pasquini L, Grimmer T, Förster S, Manoliu A, Neitzel J, Kurz A, Förstl H, Riedl V, Wohlschläger AM, Drzezga A, Sorg C. Disrupted Intrinsic Networks Link Amyloid- β Pathology and Impaired Cognition in Prodromal Alzheimer's Disease. *Cereb Cortex.* 2014; (In Press)

Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92:8856-60.

Kovacs T, Csongei V, Feller D, Ernszt D, Smuk G, Sarosi V, Jakab L, Kvell K, Bartis D, Pongracz JE. Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence. *Aging Cell.* 2014; (In Press)

Krstic D, Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2013; 9:25-34.

Kumar A, Dogra S, Prakash A. Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against D-galactose induced senescence in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009; 380:431-41.

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

Lei M, Hua X, Xiao M, Ding J, Han Q, Hu G. Impairments of astrocytes are involved in the D-galactose-induced brain aging. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369:1082-7.

Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1968; 48:534-69.

Li Z, Zhao G, Qian S, Yang Z, Chen X, Chen J, Cai C, Liang X, Guo J. Cerebrovascular protection of β -asarone in Alzheimer's disease rats: a behavioral, cerebral blood flow, biochemical and genic study. *J Ethnopharmacol.* 2012; 144:305-12.

Li SC, Sikstrom S. Integrative neurocomputational perspectives on cognitive aging, neuromodulation, and representation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002; 26:795–808.

Li SC, Lindenberger U, Sikstrom S. Aging cognition: from neuromodulation to representation. *Trends Cogn Sci.* 2001; 5:479–86.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektresh S, Collins F. GDNF: a glial line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Sci.* 1993; 260:1130-2.

Linher-Melville K, Li J. The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor during the final stage of folliculogenesis: a focus on oocyte maturation. *Reproduction*. 2013; 145:43-54.

Linker R, Gold R, Luhder F. Function of neurotrophic factors beyond the nervous system: inflammation and autoimmune demyelination. *Crit Rev Immunol*. 2009; 29:43-68.

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.

Liu P, Zhang H, Devaraj R, Ganesalingam GS, Smith PF. A multivariate analysis of the effects of aging on glutamate, GABA and arginine metabolites in the rat vestibular nucleus. *Hear Res*. 2010; 269:122-33.

Macdonald SWS, Karlsson S, Rieckmann A, Nyberg L, Bäckman L. Aging-related increases in behavioral variability: relations to losses of dopamine D1 receptors. *J Neurosci*. 2012; 32:8186-91.

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; 924:68-75.

Mattson MP, Chan SL, Duan W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev.* 2002; 82:637–72

McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22:295-318.

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.

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.

Möller C, Vrenken H, Jiskoot L, Versteeg A, Barkhof F, Scheltens P, van der Flier WM. Different patterns of gray matter atrophy in early- and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2013; 34:2014-22

Moris G, Vega JA. Neurotrophic factors: basis for their clinical application. *Neurologia.* 2003; 18:18-28.

Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Sci.* 1997; 278:412-9.

Munch G, Westcott B, Menini T, Gugliucci. A Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. *Amino Acids*. 2012; 42:1221-36.

Niewiadomska G, Mietelska-Porowska A, Mazurkiewicz M. The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. *Behav Brain Res*. 2011; 221:515-26.

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.

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; 126:183-90

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.

Pang PT, Lu B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev*. 2004; 3:407–30

Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Piruat JL, Pintado CO, Gomez-Diaz R, Lopez-Barneo J. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat Neurosci.* 2008; 11:755-61.

Perluigi M, Swomley AM, Butterfield DA. Redox proteomics and the dynamic molecular landscape of the aging brain. *Ageing Res Rev.* 2014; 13:75-89.

Pollard M, Bartolome JM, Conn PJ, Steckler T, Shaban H. Modulation of neuronal microcircuit activities within the medial prefrontal cortex by mGluR5 positive allosteric modulator. *J Psychopharmacol.* 2014; (In Press)

Prisila-Dulcy C, Singh HK, Preethi J, Rajan KE. Standardized extract of *Bacopa monniera* (BESEB CDRI-08) attenuates contextual associative learning deficits in the aging rat's brain induced by D-galactose. *J Neurosci Res.* 2012; 90:2053-64.

Pubmed – Base de dados Disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, acessado em 16/07/2014.

Qin RA, Yao XX, Huang ZY. Effects of compound danshen tablets on spatial cognition and expression of brain beta-amyloid precursor protein in a rat model of Alzheimer's disease. *J Tradit Chin Med.* 2012; 32:63-6.

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.

Reddy PH. Mitochondrial dysfunction in aging and Alzheimer's disease: strategies to protect neurons. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9:1647-58.

Rex CS, Kramár EA, Colgin LL, Lin B, Gall CM, Lynch G. Long-term potentiation is impaired in middle-aged rats: regional specificity and reversal by adenosine receptor antagonists. *J Neurosci*. 2005; 25:5956-66.

Romberg C, Bussey TJ, Saksida LM. Paying more attention to attention: towards more comprehensive cognitive translation using mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2013; 92:49-55.

Sadowsky CH, Galvin JE. Guidelines for the management of cognitive and behavioral problems in dementia. *J Am Board Fam Med*. 2012; 25:350-66.

Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, Hoyer S, Mosetter K, Reutter W. Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. *Neuropharmacology*. 2014; 77:68-80.

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

Segal S, Gibson JB, Berry GT, Mazur AT, Palmieri MJ, Reynolds RA. Effect of glucose and galactose loading in normal subjects on red and white blood cell uridine diphosphate sugars. *Biochem Mol Med.* 1995; 55:8-14.

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.* 2011; 1:a006189.

Siegel GJ, Chauhan NB. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Rev.* 2000; 33:199-227.

Silva A, Cardoso IL. Diagnóstico da galactosemia clássica. Acessado dia 21/07/2014, disponível em <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/929/2/24-34.pdf>

Straten G, Saur R, Laske C, Gasser T, Annas P, Basun H, Leyhe T. Influence of lithium treatment on GDNF serum and CSF concentrations in patients with early Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2011; 8:853-9.

Sohrabji F, Lewis DK. Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. *Neuroendocrinol.* 2006; 27:404-14.

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.

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

Teipel SJ, Flatz WH, 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.

Tomac A, Widenfalk J, Lin LF, Kohne T, Ebendal T, Hoffer BJ, Olson L. Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggest a trophic role in the adult. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:8274-8.

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

Wang HY, Bakshi K, Frankfurt M, Stucky A, Goberdhan M, Shah SM, Burns LH. Reducing amyloid-related Alzheimer's disease pathogenesis by a small molecule targeting filamin A. *J Neurosci*. 2012; 32:9773-84.

Wei H, Li L, Song Q, Ai H, Chu J, Li W. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2005; 157:245-51.

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

Willis LM, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Modulation of cognition and behavior in aged animals: role for antioxidant- and essential fatty acid-rich plant foods. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89:1602S-06S.

Wimo A, Jönsson L, Bond J, Prince M, Winblad B. The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's Dement.* 2013; 9:1-11.

Xian YF, Lin ZX, Zhao M, Mao QQ, Ip SP, Che C-T. *Uncaria rhynchophylla* ameliorates cognitive deficits induced by D-galactose in mice. *Planta Med.* 2011; 77:1977-83.

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

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.

Zhang Y, Zhang Y, Chen M, Zhou Y, Lang M4. Galactosylated poly(ϵ -caprolactone) membrane promoted liver-specific functions of HepG2 cells in vitro. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014; 1:52-8.

Zhang X, Wang J, Xing Y, Gong L, Li H, Wu Z, Li Y, Wang J, Wang Y, Dong L, Li S. Effects of ginsenoside Rg1 or 17 β -estradiol on a cognitively impaired, ovariectomized rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2012; 220:191-200.

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

ANEXO



Resolução



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

Protocolo: 033/2013-2

Professor Responsável: Josiane Budni.

Equipe: Patrícia Fernanda Schuck, Emilio Streck, João Quevedo, Sabrina Silva, Sharon Martins Freitas, Adriano Grassi Manoel, Karine Pereira Celestino, Jesiel de Medeiros, Emanuela Taiana Ferreira, Adrieli da Silveira Elias, Erico Pigozzi Cassaro, Gabriela Kozuchowski Ferreira, Samira Valvassori e Thayara Heitich Pedro.

Título: "Avaliação do efeito do ácido fólico no modelo animal de Alzheimer induzido pela Dgalactose em ratos Wistar".

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 840 Wistar 90 dias + ou - 350g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

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

Protocol number: 033/2013-2

Principal Investigator: Josiane Budni.

Researchers: Patrícia Fernanda Schuck, Emilio Streck, João Quevedo, Sabrina Silva, Sharon Martins Freitas, Adriano Grassi Manoel, Karine Pereira Celestino, Jesiel de Medeiros, Emanuela Taiana Ferreira, Adrieli da Silveira Elias, Erico Pigozzi Cassaro, Gabriela Kozuchowski Ferreira, Samira Valvassori e Thayara Heitich Pedro.

Project title: "Evaluation of folic acid effect in animal model of Alzheimer induced by D-galactose in Wistar rats."

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

Criciúma, 10 de setembro de 2013.

Patrícia Fernanda Schuck
Coordenadora da CEUA