



*Programa de Pós-graduação em  
Ciências Farmacêuticas*

Associação Ampla entre a  
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



**Avaliação do efeito profilático da  $\beta$ -glucana lasiodiplodana sobre modelo de neuroinflamação, déficit cognitivo e estresse oxidativo em ratos**

**Jéssica Wouk**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti  
Coorientador: Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva**

**Guarapuava  
2017**

JÉSSICA WOUK

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROFILÁTICO DA  $\beta$ -GLUCANA  
LASIODIPLODANA SOBRE MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO, DÉFICIT  
COGNITIVO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, da UNICENTRO.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti

**GUARAPUAVA**

**2017**

Catálogo na Publicação

Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

W938a                      Wouk, Jéssica  
Avaliação do efeito profilático da  $\beta$ -glucana lasiodiplodana sobre modelo de neuroinflamação, déficit cognitivo e estresse oxidativo em ratos / Jéssica Wouk. -- Guarapuava, 2017  
xiv, 82 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos, 2017

Orientador: Carlos Ricardo Maneck Malfatti

Banca examinadora: Carlos Ricardo Maneck Malfatti, Juliana Sartori Bonini, Guilherme Barroso Langoni Freitas

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Neuroinflamação. 3. Lasiodiplodana. 4. Comportamento. 5. Estresse oxidativo. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

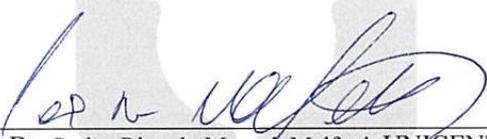
CDD 615

## TERMO DE APROVAÇÃO

JÉSSICA WOUK

*Avaliação do Efeito Profilático da  $\beta$ -Glucana Lasiodiplodia Sobre Modelo de Neuroinflamação em Ratos*

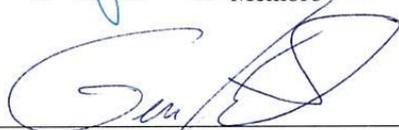
Dissertação aprovada em 24/02/2017 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti, UNICENTRO  
Presidente



Profa. Dra. Juliana Sartori Bonini, UNICENTRO  
Membro



Prof. Dr. Guilherme Barrosos Langoni de Freitas, Faculdade Guairacá  
Membro

Guarapuava - PR  
2017

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais e irmã,*

*Pelo amor incondicional, apoio e incentivo constantes que me motivam a ir sempre em busca dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por todas as bênçãos diárias que Ele me concede.

Agradeço à minha irmã, Letícia, pela amizade e motivação em todos os momentos da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Josy e Gregório, sem os quais eu nada seria ... devo tudo a eles!

Agradeço ao meu orientador, Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti, pela oportunidade, apoio e principalmente pela confiança em mim depositada nesses dois anos de trabalho.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Weber Claudio Francisco Nunes da Silva, por toda ajuda e ensinamentos concebidos durante o mestrado.

Agradeço ao prof. Dr. Mario A. A. Cunha pela parceria e disponibilidade, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, que de uma forma ou de outra fizeram com que esse trabalho fosse possível.

Agradeço principalmente pelos amigos que o mestrado me deu Vinícius, Luiz Augusto, Camila e Andressa que me apoiaram nos momentos de angústia e nervosismo e que estiveram ao meu lado durante todos esse tempo, auxiliando nos experimentos e acalmando o meu coração.

Agradeço ao Lui, que me apoiou nessa caminhada e que sempre transmitiu a mim toda paz e carinho necessários para que eu pudesse seguir e alcançar meus objetivos.

Agradeço a cada uma das minhas melhores amigas, Aline, Ariele, Fer, Kelli, Lila, Tita, Andressa, Xu, Mari e Bru pela compreensão nos meus momentos de ausência e por todo amor recebido durante a vida toda... um pedacinho de cada uma delas me faz ser quem sou hoje.

Agradeço ao meu amigo e confidente, Pedro, que além de ser uma das pessoas que mais apoia o meu crescimento na academia é também o melhor amigo que eu poderia ter.

Agradeço aos professores Dr. Jayme Augusto Peres, Msc. Ivo Kerppers, Dr. Eduardo Araújo, Dr. Najeh Maisser Khalil, Dr. Guilherme Barroso Langoni de Freitas e à professora Dra. Juliana Sartori Bonini pela ajuda fornecida durante a realização deste projeto.

Agradeço a todos os professores do colegiados do PPGCF e convidados pelos ensinamentos transmitidos.

Agradeço a CAPES pelo auxílio através da bolsa de estudos.

*“Irmão, você não percebeu que você é o único representante do seu sonho na face da terra? Se isso não fizer você correr, chapa, eu não sei o que vai.”*

*(Leandro Roque de Oliveira – Emicida)*

## RESUMO

**Introdução:** A doença de Alzheimer (DA) acomete atualmente cerca de 30 milhões de pessoas ao redor do mundo. Pelo uso limitado dos medicamentos existentes usados para amenizar os sintomas da doença já instalada, muitos autores relatam a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos que atuem no estágio inicial da DA, retardando-a ou, evitando o seu aparecimento. **Objetivo:** Por isso o presente estudo teve como objetivo analisar *in vivo* o efeito profilático de um composto natural e de fácil bioprodução, a (1-6-β-D-glucana) lasiodiplodana, frente a um modelo animal de neuroinflamação crônica. **Metodologia:** 84 ratos wistar machos foram inicialmente alocados em 7 grupos, sendo um sem tratamento (CT) e os demais tratados com: salina (LPS-SAL e SAL-SAL) ou 05, 10 e 15 mg/kg de lasiodiplodana (LPS-05mg, LPS-10mg, LPS-15mg, SAL-15mg). Após 30 dias de tratamento, os animais receberam injeção intra hipocampal de lipopolissacarídeo – LPS (LPS-SAL, LPS-05mg, LPS-10mg, LPS-15mg) ou salina (SAL-SAL e SAL-15mg). Os animais do grupo CT não sofreram intervenção cirúrgica. Para avaliar as atividades locomotora/exploratória e emocional dos ratos foram utilizados os labirintos de campo aberto e de cruz elevado, respectivamente. Para avaliação de memória foram utilizados: o labirinto de campo aberto utilizando a tarefa de reconhecimento de objeto, o labirinto aquático de Morris e o labirinto octogonal. Após avaliação comportamental, os animais foram eutanasiados e seus encéfalos foram retirados para análises de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) e nitrato/ nitrito. **Resultados:** Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas tarefas de controle comportamental entre os grupos. Na avaliação de memória no labirinto aquático de Morris nenhum grupo tratado obteve resultado estatisticamente significativo, porém houve uma tendência do grupo LPS-05mg em ser diferente do grupo LPS-SAL. Na tarefa de reconhecimento de objetos nenhum grupo tratado demonstrou resultados significativos, porém, houve uma tendência do grupo LPS-10mg em ser diferente do grupo LPS-SAL. O protocolo utilizado no labirinto octogonal não foi eficaz para avaliar a memória dos ratos do presente estudo. Nas dosagens de TBARS e nitrato/nitrito o único grupo que mostrou-se significativamente diferente ( $P < 0,01$ ) do grupo LPS-SAL foi o LPS-10mg. **Conclusão:** Conclui-se que a dose de 5 mg/kg e 10 mg/kg de lasiodiplodana pode ser capaz de reverter o quadro amnésico subsequente ao processo neuroinflamatório, no se que diz respeito a memória associativa e não associativa, respectivamente, e a dose de 10 mg/kg é capaz de amenizar o quadro de estresse oxidativo ocasionado pela neuroinflamação.

**Palavras-chave:** neuroinflamação, lasiodiplodana, comportamento, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) reaches 30 million people around the world. By the limited usage of the existent drugs to treat AD, that only relieve the symptoms of it, several authors report the necessity of developing new compounds that are able to act in the early stages of AD, delaying it or, avoiding its appearance. **Objective:** Because of that, this study aims to analyze the prophylactic effect of a natural compound, (1-6)- $\beta$ -D-glucan, lasiodiplodana, over an animal model of a chronic neuroinflammation. **Methodology:** 84 male wistar rats were allocated in 7 groups, being one receiving no treatment (CT) and the other receiving: saline (LPS-SAL and SAL-SAL) or 05, 10 and 15 mg/kg of lasiodiplodana (LPS-05mg, LPS-10mg, LPS-15mg and SAL-15mg). After 30 days of treatment, the animals received hippocamp injections of lipopolysaccharide – LPS (LPS-SAL, LPS-05mg, LPS-10mg and LPS-15mg) or saline (SAL-SAL e SAL-15mg). CT group did not pass through any surgical intervention. The locomotor/ exploratory and emotional activities were analyzed in open field and elevated plus mazes, respectively. In order to evaluate the memory of the animals, three tools were utilized: the open field maze with object recognition task, Morris water maze and the radial maze. After the behavioral tests, euthanasia was made and the brain of the rats were taken to later analyses of TBARs (thiobarbituric acid reactive substance) and nitrate/nitrite. **Results:** No significant difference was found in behavioral control tests among groups. In Morris water maze task, no group demonstrated significant results, but LPS-05mg group had a tendency to be different from LPS-SAL group. In the object recognition test no group showed significant results, however, LPS-10mg group had a tendency to be different from LPS-SAL group. The protocol utilized in radial maze was not efficient in evaluating the memory deficit of the rats from present study. In the analyses of TBARs and nitrate/nitrite the only group that was significantly ( $P < 0.01$ ) different from LPS-SAL was the one treated with 10 mg/kg of lasiodiplodana (LPS-10mg). **Conclusion:** It was concluded that the treatments with 05 mg/kg and 10mg/kg of lasiodiplodana were able to revert the memory deficit caused by the neuroinflammatory model, concerning associative and non-associative memories respectively, and the dosage of 10 mg/kg was capable of relieving the oxidative stress condition triggered by neuroinflammation.

**Key-words:** neuroinflammation, lasiodiplodana, behavior, oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Diferença entre cérebros de pessoas saudáveis (A) e pessoas com DA (B).....	4
<b>Figura 2</b> - Novelas neurofibrilares .....	4
<b>Figura 3</b> - Placas Senis. Fonte .....	5
<b>Figura 4</b> - Papel do peptídeo $\beta$ -amilóide (BA), inflamação e estresse oxidativo na Doença de Alzheimer (DA) .....	11
<b>Figura 5</b> - Cirurgia esteotáxica para microinjeção bilateral de soluções na região CA1 do hipocampo .....	24
<b>Figura 6</b> - Labirinto em cruz elevado .....	25
<b>Figura 7</b> - Labirinto de campo aberto – análise locomotora e exploratória.....	26
<b>Figura 8</b> - Parâmetros comportamentais avaliados durante a tarefa de campo aberto .....	26
<b>Figura 9</b> - Labirinto de campo aberto – tarefa de reconhecimento de objeto.....	27
<b>Figura 10</b> - Imagem ilustrativa da tarefa de reconhecimento de objeto realizada no labirinto de campo aberto.....	27
<b>Figura 11</b> - Labirinto Aquático de Morris – Divisão virtual dos quadrantes .....	28
<b>Figura 12</b> - Labirinto Octogonal.....	29
<b>Figura 13</b> - Dicas visuais expostas acima das portas do labirinto octogonal e nas paredes que cercam o aparato .....	30
<b>Figura 14</b> - Protocolo da tarefa de avaliação de memória no labirinto octogonal.....	30
<b>Figura 15</b> - Definição de erro no labirinto octogonal .....	31
<b>Figura 16</b> - Comparação dos parâmetros avaliados na tarefa de controle comportamental no labirinto de cruz elevado.....	34
<b>Figura 17</b> - Comparação dos parâmetros avaliados na tarefa de controle comportamental no labirinto de campo aberto .....	34
<b>Figura 18</b> - Comparação do tempo de latência avaliado na tarefa realizada no Labirinto Aquático de Morris.....	35
<b>Figura 19</b> - Comparação do tempo de permanência avaliado na tarefa realizada no Labirinto Aquático de Morris.....	36
<b>Figura 20</b> - Comparação do tempo de cruzamentos avaliado na tarefa realizada no Labirinto Aquático de Morris.....	36
<b>Figura 21</b> - Comparação dos valores de índice de discriminação na tarefa de reconhecimento de objeto .....	37
<b>Figura 22</b> - Alteração nos níveis de TBARs no hipocampo de ratos .....	39

**Figura 23** - Alteração nos níveis de Nitrato/nitrito no córtex cerebral de ratos ..... 40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Grupos experimentais .....	23
<b>Tabela 2</b> - Comparação dos valores obtidos dos cinco parâmetros avaliados no Labirinto Octogonal entre os grupos na 10ª sessão de retenção.....	38
<b>Tabela 3</b> - Comparação dos valores obtidos dos cinco parâmetros avaliados na tarefa no Labirinto Octogonal do mesmo grupo no primeiro e no último dia do teste de retenção. ...	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina  
AChE - Acetilcolinesterase  
ADI - *Alzheimer Disease International*  
ADRDA - *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*  
AINEs - Anti-inflamatórios não esteroides  
APP - Proteína precursora  $\beta$ -amilóide  
BAs – Braços abertos  
BFs – Braços fechados  
CDR - Avaliação Clínica de Demência  
COX2 - Ciclo-oxigenase do tipo 2  
DA - Doença de Alzheimer  
E.B.A. - Entradas nos braços abertos  
E.B.F. - Entradas nos braços fechados  
EMR - Erro de memória de referência  
EMT - Erro de memória de trabalho  
EMTR - Erro de memória de trabalho-referência.  
EPM - Erro Padrão Médio  
EPS - Exopolissacarídeos  
EROs - Espécies reativas de oxigênio  
FDA - *U.S. Food and Drug Administration*  
GFAP - *Glial fibrillary acid protein*  
iNOS - Óxido nítrico-sintase induzido  
LABEN - Laboratório de Bioquímica do Exercício e Neurociências  
LPS - Lipopolissacarídeo  
MDA - Malonildialdeído  
NIA - *National Institute on Aging*  
NIH - *National Institutes of Health*  
NINDS - *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*  
NO – Óxido nítrico  
NOS - Óxido nítrico sintetase  
PBS - Tampão fosfato salino  
PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

RCAN1 - Regulador de calcineurina do tipo 1

SOD - Superóxido dismutase

T.B.A. - Tempo nos braços abertos

T.B.F. - Tempo nos braços fechados

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

$\beta$ A -  $\beta$ -amilóide

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A doença de Alzheimer (DA) .....	1
1.1.1. Características gerais .....	1
1.1.2. Cognição .....	1
1.1.3. Características fisiopatológicas .....	3
1.1.4. Hipótese $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A) x Hipótese da proteína TAU.....	5
1.1.5. DA como um processo neuroinflamatório: novas descobertas .....	6
1.1.6. Estresse oxidativo na DA .....	10
1.1.7. Fármacos atualmente utilizados por pacientes com DA.....	11
1.1.8. Anti-inflamatórios: nova estratégia terapêutica para a DA .....	12
1.2. Produtos naturais.....	14
1.2.1. Exopolissacarídeos (EPS).....	15
1.2.2. $\beta$ -glucanas.....	15
1.2.3. $\beta$ -glucanas e seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes.....	16
1.2.4. $\beta$ -glucana do <i>Lasiodiplodia theobromae</i> MMPI.....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo geral .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
3. JUSTIFICATIVA.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
4.1. Animais do experimento .....	21
4.2. Preparo da $\beta$ -glucana lasiodiplodana .....	22
4.2.1. Preparação do inóculo .....	22
4.2.2. Cultivo submerso do fungo e a recuperação do exopolissacarídeo .....	22
4.3. Desenho experimental.....	23
4.4. Estereotaxia e indução da neuroinflamação.....	23

4.5.	Testes comportamentais.....	24
4.5.1.	Tarefas de controle comportamental .....	24
4.5.2.	Tarefas para avaliação de memória .....	26
4.6.	Eutanásia e coleta de amostras biológicas .....	32
4.7.	Análises laboratoriais.....	32
4.7.1.	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs).....	32
4.7.2.	Óxido nítrico (NO) .....	33
4.8.	Análise estatística .....	33
5.	RESULTADOS .....	33
5.1.	Tarefas de controle comportamental.....	33
5.2.	Tarefas para avaliação de memória.....	34
5.2.1.	Labirinto aquático de Morris .....	35
5.2.2.	Campo aberto – reconhecimento de objeto .....	37
5.2.3.	Labirinto octogonal .....	38
5.3.	Análises laboratoriais.....	39
5.3.1.	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) .....	39
5.3.2.	Nitrato/nitrito.....	40
6.	DISCUSSÃO.....	40
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1. A doença de Alzheimer (DA)

#### 1.1.1.Características gerais

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa sem causa e cura conhecidos que acomete principalmente pessoas idosas. A DA é progressiva e tem como característica principal a morte das células cerebrais que ocasiona uma atrofia local (BRASIL, 2002). Apesar do número crescente de pesquisas realizadas, muito ainda precisa ser descoberto sobre as mudanças biológicas que causam a DA, porque a sua progressão varia entre indivíduos, e como a doença pode ser prevenida, retardada ou curada (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2015).

São conhecidos dois tipos de DA, a esporádica e a familiar. A DA esporádica é a mais comum, sendo 99% dos casos diagnosticados. Este tipo de DA pode afetar adultos de qualquer idade, que têm ou não antecedentes familiares com a doença. A idade é o maior fator de risco, tendo em vista que a maioria dos pacientes que sofrem do mal de Alzheimer tem 65 anos ou mais. Isso é notório quando observamos que 15% dos pacientes com DA têm entre 65-74 anos, e 44% deles têm 75-84 anos (Hebert et al, 2013). Já a DA familiar é mais rara, porém preocupante pelo fato de que, se um dos progenitores carrega este gene mutado, a chance do seu filho também herdá-lo é de 50% (LOY et al, 2014). É difícil afirmar ao certo o número de mortes acarretadas pela doença de Alzheimer, uma vez que muitos casos não são corretamente diagnosticados ou então porque a DA é reportada muitas vezes como uma causa subjacente de óbito. Mesmo com todos esses empecilhos para se obter números precisos, é estimado que em 2013, cerca de 84.767 de pessoas morreram por conta da DA (XU et al, 2016).

Ao longo da progressão da doença o indivíduo apresenta alterações de personalidade e humor, incluindo apatia e depressão, comportamentos agressivos e déficits cognitivo e motores (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2014).

#### 1.1.2. Cognição

Cognição é um termo usado para caracterizar processos psicológicos internos de um indivíduo, que podem por sua vez, ser avaliados através de mudanças comportamentais do

mesmo. A cognição é uma expressão que engloba processos de aprendizagem, memória e atenção, bem como linguagem, percepção, raciocínio e inteligência (BUSHNELL, 1998). Segundo a *Alzheimer's Disease International* (2013), para diagnosticar um paciente acometido pela DA, este deve apresentar comprometimento em pelo menos duas funções cognitivas.

Para avaliar o estágio demencial do paciente com DA é aplicada um questionário para avaliação clínica de demência, o CDR (*Clinical Dementia Rating*), de acordo com as regras estabelecidas por Morris (1993). Esta avaliação baseia-se nas informações obtidas durante uma entrevista com o idoso ou cuidador. O CDR é dividido nas seguintes categorias: memória, orientação, julgamento e solução de problemas, assuntos da comunidade, lar, hobbies e cuidados pessoais. Cada categoria é independente e pode ser classificada em: sem demência, demência questionável (CDR 0,5), leve (CDR 1), moderada (CDR 2) ou grave (CDR 3). Ao final, é definido o estágio demencial geral do idoso pelo *score* obtido.

O prejuízo cognitivo mais evidente na doença de Alzheimer é o déficit de memória. A memória pode ser definida como a aquisição, conservação e eventual evocação de informações adquiridas através de experiências. A memória está intimamente ligada a outro aspecto cognitivo: o aprendizado, o qual é caracterizado pela aquisição de memórias. Desta forma, não há memória sem aprendizado (IZQUIERDO, 1989). Ivan Izquierdo (1989), afirma que indivíduo é aquilo que ele lembra e além disso, é aquilo que escolhe esquecer (ou a pessoa escolhe por si, ou o cérebro escolhe por ela). Ele também pontua que a memória é o que diferencia uma pessoa da outra, ou seja, dá significado a palavra individualidade. Quando uma pessoa é acometida pela doença de Alzheimer, começa a esquecer informações básicas do seu cotidiano, eventos passados e em casos mais avançados, suas informações pessoais, ou seja, quem é (IZQUIERDO, 2004; IZQUIERDO et al, 2006).

Em seu estágio inicial, a doença quando diagnosticada é tida como déficit cognitivo leve, caracterizando-se por um nível de debilitação da memória que vai além do esperado no processo de envelhecimento normal, mas que por sua vez, não interfere significativamente nas suas atividades diárias. Nesse estágio os pacientes ainda não apresentam nenhum sintoma de demência (PETERSEN et al, 1999; GAUTHIER, 2006) e são ainda independentes, pois conseguem desempenhar atividades motoras como dirigir, trabalhar, entre outros. Normalmente nessa fase os indivíduos apresentam lapsos de memória, esquecendo palavras ou localização de objetos de uso diário (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016). Por apresentarem esquecimentos sem importância, esses sintomas são muitas vezes ignorados

pelos familiares e julgados erroneamente como parte do ciclo natural do envelhecimento (BRASIL, 2002).

Durante a evolução da doença, os processos patogênicos subjacentes causam comprometimento irreversível das regiões cerebrais responsáveis pelo funcionamento cognitivo-intelectual, resultando assim em um quadro demencial (SHAHANI & BRANDT, 2002).

À medida que a doença progride, os sintomas se agravam e os pacientes passam a necessitar de cuidados especiais de familiares e/ou cuidadores. Esquecimento de informações importantes como, endereço residencial e número de telefone e também de eventos passados, como o local onde trabalhavam/estudavam ocorrem com frequência. No estágio final da doença, os pacientes perdem a capacidade de responder ao ambiente em que se encontram, conversar e controlar seus movimentos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016).

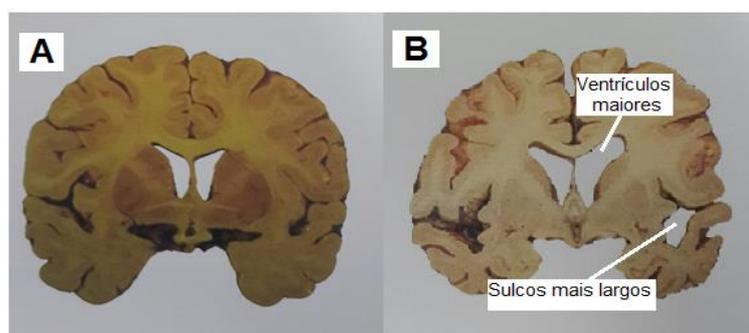
### 1.1.3.Características fisiopatológicas

O descobrimento da DA se deu por Alois Alzheimer, um renomado psiquiatra alemão que relatou seu estudo de caso sobre um paciente demente (ALZHEIMER, 1907). Nesse trabalho o pesquisador descreveu os aspectos fisiopatológicos de uma doença que acometia o córtex cerebral, a qual hoje é mundialmente conhecida como doença de Alzheimer. Alguns anos depois, Alois foi capaz de incluir algumas características adicionais ao seu primeiro estudo, como algumas ilustrações de mudanças neurofibrilares típicas da doença, as quais são chamadas hoje de emaranhados/novelas neurofibrilares (ALZHEIMER, 1911; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016).

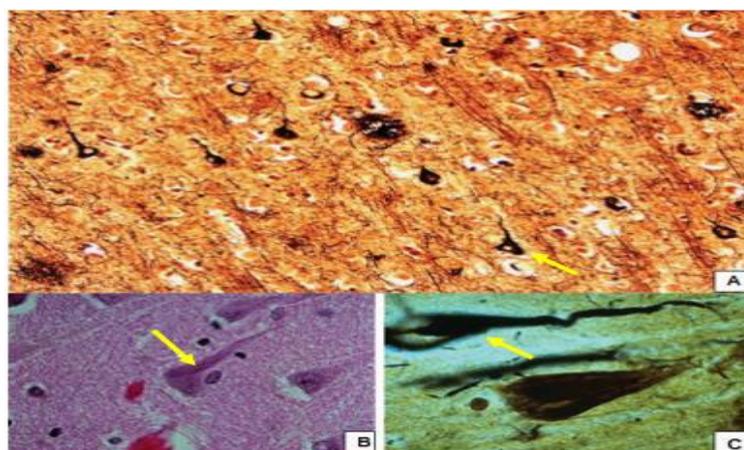
Outra característica importante da DA foi descrita no mesmo ano em que Alois Alzheimer publicou o seu primeiro artigo, mas por outro pesquisador alemão, Fischer. No começo do século passado, ele estudou pacientes com demência senil. Em seus estudos o pesquisador relatou a aparição de placas senis nos cérebros dos seus pacientes (FISCHER, 1907). Mesmo depois de mais de um século destas importantes descobertas, placas senis e emaranhados neurofibrilares são, até os dias de hoje, usados como critérios determinantes para o diagnóstico *post mortem* da doença de Alzheimer (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016).

Com o desenvolvimento de novas ferramentas de estudo e pesquisa, as características anatomopatológicas e histopatológicas podem ser mais claramente explicadas e

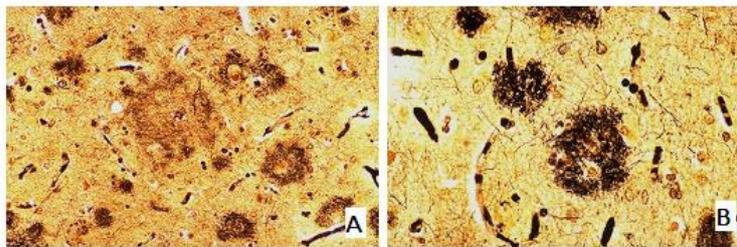
demonstradas. Os cérebros de indivíduos idosos, e principalmente daqueles com a doença de Alzheimer, são em média menores e mais leves do que os de indivíduos jovens e saudáveis. Alguns giros são mais finos e separados por sulcos mais profundos e abertos (como mostra a Figura 1). Em análises microscópicas, nos cérebros de pacientes que sofrem da doença pode-se observar um depósito denso de peptídeo  $\beta$ -amilóide denominado placa senil (Figura 2). No citoplasma dos neurônios restantes háovelos neurofibrilares (como demonstrado na Figura 3). A quantidade de neurônios em algumas regiões cerebrais se encontra baixa, bem como o número de sinapses entre os mesmos (LENT, 2005). A perda seletiva de neurônios ainda não foi compreendida pelos pesquisadores, o que não anula a importância de se desenvolver novos medicamentos para retardar a evolução da doença, ou mesmo bloquear o seu agravamento (SERENIKI & VITAL, 2008).



**Figura 1** - Diferença entre cérebros de pessoas saudáveis (A) e pessoas com DA (B). Fonte: Adaptado de LENT, 2005.



**Figura 2** - Novelos neurofibrilares. Fonte: Adaptado de Neuro Pathology (2012). Em A, coloração Bielschowsky prata. Em B, Hematoxilina Eosina (H.E.). Em C, coloração de prata. Fonte: Adaptado de Neuro Pathology (2012).



**Figura 3** - Placas Senis. Fonte: Adaptado de Neuro Pathology (2012). Em A e B, coloração Bielschowsky prata. Fonte: Adaptado de Neuro Pathology (2012).

#### 1.1.4. Hipótese $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A) x Hipótese da proteína TAU

Uma das hipóteses que tenta explicar a etiologia da doença de Alzheimer é a hipótese  $\beta$ -amiloidal. Acredita-se que a alta expressão e a síntese anormal da proteína precursora  $\beta$ -amilóide (APP) ocasionam um acúmulo do peptídeo beta-amilóide ( $\beta$ A) no cérebro (acúmulo este chamado de placa senil) e que esse seja o principal causador da neurodegeneração observada nos tecidos cerebrais de pacientes com DA. De acordo com essa hipótese, o restante dos achados dessa patologia, tais como formação de emaranhados neurofibrilares contendo proteína TAU, são resultantes do desequilíbrio entre a produção e retenção do peptídeo  $\beta$ -amilóide (REVETT et al, 2012). Acredita-se que este peptídeo, gera radicais livres em uma reação catalisada por metais. Esse acontecimento induz a morte de células neuronais por um processo mediado por espécies reativas de oxigênio que causam danos na membrana lipídica, nas proteínas e ácidos nucleicos dos neurônios (FUJIHARA, 2012).

Outra hipótese usada para tentar explicar a etiologia da doença de Alzheimer está relacionada com a proteína TAU. A proteína TAU tem como principal função manter a estabilidade dos microtúbulos de indivíduos saudáveis. Porém, por mecanismos ainda não elucidados há um acúmulo de proteína TAU associada aos microtúbulos e um aumento da sua versão hiperfosforilada no cérebro, formando os conhecidos emaranhados neurofibrilares intracelulares, característica encontrada no córtex parietal-occipital do cérebro de pacientes em estágio inicial da DA (CHO et al, 2017).

A hipótese baseada no acúmulo intracelular de proteína TAU afirma que esse fato leva à desestruturação dos microtúbulos, colapso espinhal dos dendritos e degeneração dos axônios (MACCIONI et al, 2010). Estudos recentes também correlacionam os achados característicos da DA, principalmente o aparecimento de emaranhados neurofibrilares com déficits cognitivos (NELSON et al, 2012). Como resultado de todos esses acontecimentos, a

comunicação entre os neurônios fica debilitada e em seguida, há uma expressiva morte celular em várias regiões cerebrais. Segundo (FU et al, 2017) a própria proteína TAU pode causar uma endopatologia que transmite a neurodegeneração de uma célula para outra, podendo causar uma série de complicações, entre elas, o déficit de memória espacial..

Em contraposto, estudos recentes propõem que a toxicidade provocada pelo peptídeo  $\beta$ A e pela proteína TAU não ocorre de maneira independente. Essa proposta baseia-se em ambas as hipóteses já citadas, porém, correlacionando-as de tal forma que a doença de Alzheimer não poderia ser explicada e entendida se baseada em somente uma delas. De acordo com essa proposta o peptídeo  $\beta$ A causa a hiperprodução de EROs (espécies reativas de oxigênio) durante a doença de Alzheimer. Cronicamente o estresse oxidativo, causado pelo aumento de EROs, provoca a ativação do regulador de calcineurina 1 (RCAN1), bem como a ativação da quinase p38. Segundo essa proposta, ambos os processos resultam na hiperfosforilação da proteína TAU que causa a DA (LLORET et al, 2015). Em uma revisão de literatura feita por Nelson et al. (2012), foi concluído que muitos centros de pesquisa independentes apoiam fortemente a percepção de que a DA é uma doença definida pela presença de placas de peptídeo  $\beta$ A e emaranhados neurofibrilares.

#### 1.1.5.DA como um processo neuroinflamatório: novas descobertas

Um biomarcador é uma característica que é mensurada e avaliada que servirá como um indicador de (a) processos biológicos normais, (b) processos patológicos ou então de (c) respostas farmacológicas frente a uma intervenção terapêutica. Um biomarcador auxilia no diagnóstico de uma doença, estima o risco e prognóstico da mesma, ajuda a estimar em que estágio a doença está e por fim, monitora a progressão e/ou a reposta do organismo do paciente frente à terapia (BDWG, 2001). Como explicado anteriormente, os biomarcadores mais conhecidos e bem estabelecidos da DA são as três proteínas: peptídeo  $\beta$ A 1-42, TAU e TAU fosforilada (BLENNOW et al, 2010; CLARK et al, 2003; SUNDERLAND et al, 2003).

Apesar de importantes, as lesões cerebrais causadas por esses biomarcadores, placas amiloidais (causadas pelo depósito extracelular de peptídeo  $\beta$ A) e novelos neurofibrilares (acarretados pelo acúmulo intraneuronal de proteína TAU hiperfosforilada), são somente utilizadas para diagnóstico *post mortem* de indivíduos acometidos pela DA. Durante a vida, o paciente com DA é clinicamente avaliado baseado nas diretrizes impostas pela *National Institute of Neurological Disorders and Stroke–Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association* (NINDS-ADRDA) (MCKHANN et al, 1984).

Porém, ainda permanece incerto se as placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares são realmente as causas primárias da DA. Essas dúvidas são provenientes de descobertas recentes que mostraram que carga de placa amilóide correlaciona-se fracamente com a progressão e severidade da demência na DA, podendo um indivíduo em estágio inicial da doença não ser diagnosticado por não apresentar sinais amiloidogênicos em seu cérebro (LUCZKOWSKI, 2016).

Até mesmo o Instituto Nacional de Saúde americano, *National Institutes of Health - NIH* (no qual fazem parte *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*, NINDS, e o *National Institute on Aging*, NIA) relataram em 2013 que a relação das placas  $\beta$ A e dos emaranhados neurofibrilares com a DA ainda não está totalmente esclarecida, e que ambos os achados podem ser a causa da doença, ou então, sinalizadores de outro processo que conduz a morte neuronal na DA.

Estudos recentes descrevem a necessidade de se pesquisar novos marcadores biológicos para a DA que sejam mais sensíveis e específicos do que os já existentes, e que possam aumentar, sozinhos ou em combinação com os marcadores já estabelecidos, a exatidão dos diagnósticos atuais (FAGAN & PERRIN, 2012). Para mostrar a amplitude da variação da precisão dos exames clínicos atuais para o diagnóstico de DA, Beach et al. (2012) realizaram uma pesquisa com aproximadamente 900 pacientes portadores desta doença distribuídos por 30 centros de DA americanos. A análise feita por Beach e colaboradores mostrou sensibilidade oscilante entre 70.9 e 87.3% e especificidade entre 44.3 e 70.8%, dependendo do critério histopatológico de diagnóstico empregado.

Com as falhas ao tentar explicar a etiologia da DA somente pelas hipóteses  $\beta$ -amiloidal e a relacionada à proteína TAU e os emaranhados neurofibrilares, e conseqüentemente diagnosticá-la através desses marcadores, surgiu uma nova hipótese. Esta pressuposição é a favor de diferenciar cuidadosamente os enfoques terapêuticos da DA de acordo com mecanismos subjacentes, e é conhecida como resposta adaptativa. A hipótese da resposta adaptativa propõe que a proteína  $\beta$ A pode acumular-se por uma resposta adaptativa frente a estresses crônicos a nível cerebral (CASTELLO & SORIANO, 2013). Segundo essa teoria dentre os estímulos que ocasionam esse estresse podem ser citados: a regulação metabólica (incluindo a homeostasia do colesterol, resistência à insulina, entre outros), os fatores genéticos, o estresse oxidativo e a resposta inflamatória. Cada um destes fatores é capaz de provocar uma resposta que resultará em uma maior produção de peptídeo  $\beta$ A, e a natureza dessa resposta, segundo essa hipótese, determinará a progressão clínica da DA.

Corroborando com essa nova premissa, Krstic e Knuesel (2013) defendem a hipótese de que a DA de início tardio seja causada por um processo inflamatório crônico. Segundo esses pesquisadores, essa condição desregula o mecanismo responsável por eliminar proteínas neuronais danificadas que se acumulam no cérebro ao longo dos anos. Ao mesmo tempo, esse processo inflamatório crônico causa uma deficiência na integridade do axônio e também em seu transporte, evento este associado a proteína TAU.

Pesquisas realizadas nas últimas décadas têm demonstrado que o dano neuronal progressivo associado à DA pode ser consequência de reações inflamatórias locais no sistema nervoso central (AHMED, THABET, MOHAMED, et al, 2014; MCGEER & MCGEER, 2010; AKIYAMA et al, 2000; TUPPO & ARIAS, 2005; WYSS-CORAY, 2006). Para entender melhor sobre a cascata de eventos que correlacionam a neuroinflamação e a DA é importante entender os aspectos de cada componente inflamatório da doença, como os tipos de células participantes deste processo e os mediadores pró- e anti-inflamatórios liberados por elas.

#### 1.1.5.1.Micróglia

Alguns aspectos relacionados às células participantes no processo de neuroinflamação, como a micróglia e astrócitos, não foram bem desvendados ao que se refere à sua atuação na DA. Os mesmos podem atuar tanto como neuroprotetores quanto ter função neurodegenerativa, o que dificulta o entendimento de sua finalidade para com o processo patológico (SERENIKI & VITAL, 2008).

A micróglia é responsável por defender o cérebro de danos ou invasores patogênicos. Em situações patológicas as micróglia agem como os macrófagos do sistema imune, migrando para o local lesado, circundando-o e limpando os fragmentos celulares existentes nessa área (FETLER & AMIGORENA, 2005). Nos casos de eventos neurodegenerativos, as micróglia reagem liberando uma grande variedade de mediadores pró-inflamatórios como espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas, fatores do complemento, radicais livres, entre outros (GRIFFIN et al, 1998). Nestas circunstâncias as micróglia também agem induzindo o sistema de enzimas inflamatórias a produzir, por exemplo, a oxido nítrico-sintase induzido (iNOS) e a ciclo-oxigenase 2 (COX2). Todos esses fatores podem contribuir para a disfunção e morte neuronal, isoladamente ou em conjunto (ABBAS et al, 2002; BEZZI et al, 2001; BROWN & BAL-PRICE, 2003), criando, por fim, um ciclo vicioso (GRIFFIN et al, 1998).

O peptídeo  $\beta$ A promove neurodegeneração indiretamente quando ativa as células da micróglia (AKIYAMA et al, 2000; TAN et al, 1999). O que acontece na DA é que as micróglias detectam a presença das agregações de peptídeo  $\beta$ A e respondem a elas, porém uma possível perda de habilidade dessas células em responder à agregação pode contribuir para o desenvolvimento da doença, uma vez que essa perda permitiria que a agregação prosseguisse. Essa teoria é suportada por estudos genéticos em pacientes com DA que descrevem mutações nas moléculas do sistema imune inato que poderiam comprometer a capacidade de resposta das micróglias (HENEKA et al, 2015).

Além disso, estudos recentes com ratos transgênicos APPV717 relataram a ativação das células da glia como um evento que precede a aparição de depósitos de placas amiloidais no cérebro de ratos com 3 meses de idade (HENEKA et al, 2005). Em paralelo, outro estudo também demonstrou que a ativação das micróglias pode ocorrer mesmo na ausência de depósitos  $\beta$ -amiloidais, sendo o seu aparecimento considerado como um evento precursor da DA (NUNOMURA et al, 2001).

#### 1.1.5.2. Neurônios

Os neurônios são outras células que podem contribuir para a progressão da DA. Diferente do que se acreditava há algum tempo, os neurônios têm um papel muito mais importante do que meramente servir como um componente passivo na neuroinflamação. Evidências sugerem que estas células podem gerar moléculas inflamatórias por si só. Da mesma forma que as células da glia, os neurônios também produzem os radicais livres, como NO (óxido nítrico) e peroxinitrito, que podem causar disfunção neuronal e morte cerebral (BOJE & ARORA, 1992; HENEKA et al, 1998). Além disso, uma alta expressão da enzima iNOS foi descrita em neurônios em degeneração no cérebro de pacientes com a doença Alzheimer. Os neurônios podem também ser uma fonte de uma série de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-6 e TNF- $\alpha$  (HENEKA & FEINSTEIN, 2001; HEKENA et al, 2001; HENEKA, 2006).

As células citadas acima, micróglias e neurônios, estão intimamente ligadas à processos neuroinflamatórios, como já explicado. Interessantemente, todas, de uma maneira ou de outra, acarretam um aumento de radicais livres no organismo, podendo causar então um estresse oxidativo.

### 1.1.6. Estresse oxidativo na DA

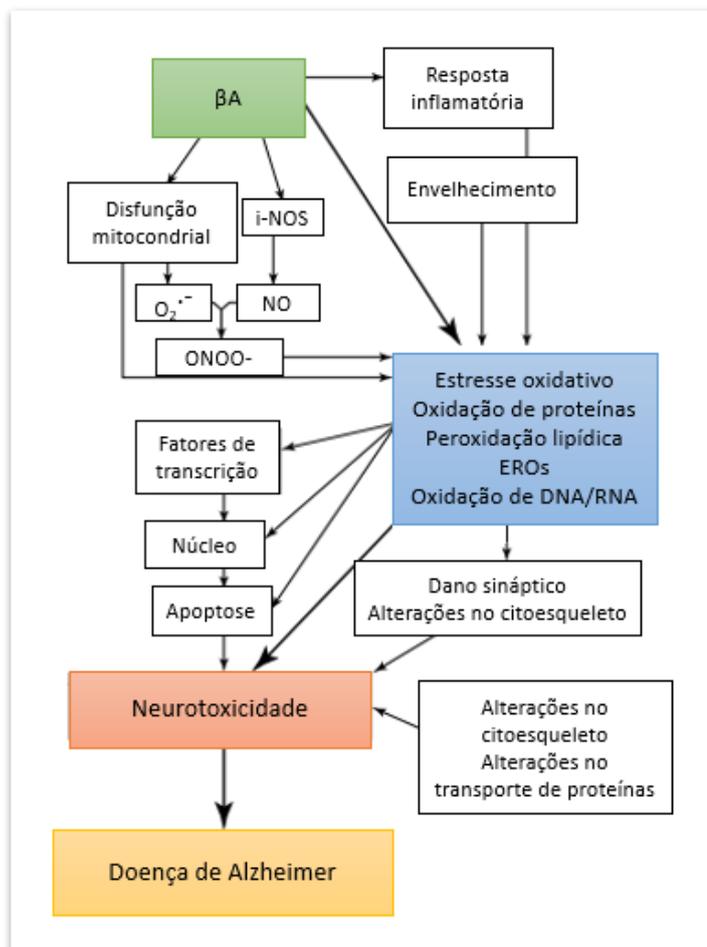
O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre os níveis de compostos pró-oxidantes e antioxidantes no organismo, com predominância dos primeiros, que favorecem uma geração excessiva de radicais livres. Esses radicais são átomos ou moléculas altamente reativos que possuem um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica. Para se manter estáveis, esses radicais fazem ligação com biomoléculas do organismo, conduzindo-as à oxidação, e uma consequente perda de função biológica e/ou desequilíbrio homeostático (BARREIROS et al, 2006). Quanto às ações nocivas dos radicais livres no organismo, a primeira é a atuação dos mesmos contra os ácidos graxos poli-insaturados constituintes das membranas celulares. Nesse momento uma complexa cadeia de eventos ocorre, iniciando-se com a peroxidação lipídica que resultará na produção de aldeídos reativos, podendo ser citados o malondialdeído e 4-hidroxinonal (BENEDETTI et al, 1984; ESTERBAUER et al, 1982).

A hipótese de que os radicais livres possam estar envolvidos na DA, foi originalmente baseada no envolvimento do estresse oxidativo no envelhecimento, com a Teoria do Envelhecimento via Radicais Livres, de Denham Harman (HARMAN, 1956). Acredita-se que a ação dos radicais livres, gerados durante o metabolismo normal, causaria um dano cumulativo às macromoléculas, tais como os ácidos graxos poliinsaturados das membranas lipídicas, proteínas essenciais e DNA. Esse dano se tornaria um ciclo vicioso em que as próprias injúrias causadas pelos radicais livres, culminariam uma produção de radicais livres. Esse efeito nocivo está relacionado também ao declínio funcional no cérebro, se manifestando por uma deterioração nas funções cognitivas e na capacidade motora. A ação dos radicais livres sobre essas estruturas celulares poderia culminar na perda da sua função normal e na morte celular (HEKIMI et al, 2011; DEL VALLE et al, 2011).

Pesquisadores ainda estão por desvendar o verdadeiro papel do dano oxidativo na DA. O estresse oxidativo está frequentemente associado a diferentes tipos de doenças, embora seja difícil identificar se o mesmo é o causador ou a consequência da condição observada (SORG, 2004). Enquanto alguns estudos relatam que o acúmulo de peptídeo  $\beta$ A seja a causa do aumento do dano oxidativo (BEHL et al, 1994; HENSLEY et al, 1994), outros afirmam que o inverso ocorra, sendo assim, assumem que o dano oxidativo seja o causador dos demais processos patológicos da DA (YAN et al, 1995; FREDERIKSE et al, 1996; MISONOU et, 2000). Nunomura e colaboradores (2001) realizaram análises *post-mortem* de pacientes com DA e garantem que a segunda hipótese seja a verdadeira, atestando que o dano oxidativo

seja o evento que precede a DA e que o mesmo, ainda, decline à medida que a doença progride. A hipótese de que o estresse oxidativo ocorra antes mesmo dos achados mais famosos e característicos da DA (placas senis e emaranhados neurofibrilares) pode abrir caminho para novos enfoques terapêuticos e ensaios clínicos para o tratamento desta doença (PERRY, CASH, SMITH, 2002).

A associação entre o estresse oxidativo, doenças neurológicas degenerativas e as doenças inflamatórias é o mecanismo de dano celular mais aceito para explicar essas condições (DUARTE et al, 2008). Este processo é explicado no esquema da figura a seguir (Figura 04).



**Figura 4** - Papel do peptídeo  $\beta$ -amilóide (BA), inflamação e estresse oxidativo na Doença de Alzheimer (DA). Fonte: Adaptado de Butterfield et al. (2001).

#### 1.1.7. Fármacos atualmente utilizados por pacientes com DA

No cérebro de pessoas com a DA a quantidade de acetilcolina (ACh) está reduzida, e a deficiência desse neurotransmissor pode ocasionar a aparição dos sintomas da doença,

pois ele tem função diretamente correlacionada com os processos motores, cognitivos e de memória. Fármacos usados nos dias de hoje por pacientes que sofrem da doença de Alzheimer são chamados de anticolinesterásicos ou inibidores de colinesterases, pois inibem a enzima acetilcolinesterase (AChE), evitando assim que o restante de ACh seja hidrolisada/degradada. Estes medicamentos podem retardar a progressão da doença, aliviando também alguns sintomas (podendo perder esse efeito depois de algum tempo de uso), porém não tem a capacidade de reverter o quadro e tão pouco detê-lo por completo. Acredita-se que o uso de anticolinesterásicos induz um maior efeito em pacientes que estão no estágio inicial da doença, tendo pouca eficácia em indivíduos com demência severa. Estes ainda parecem não ser eficientes para todos os pacientes e seu efeito pode variar de pessoa para pessoa (CAYTON et al, 2000).

Apesar de longos anos de pesquisa para desenvolver drogas seguras e eficientes para o tratamento da DA, as opções ainda são escassas. Atualmente as drogas utilizadas para tratar os sintomas da DA permitidos pela Agência americana *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) são somente: donepezil (Aricept®), galantamina (Reminyl®), rivastigmina (Exelon®), memantina (Namenda®) e donepezil e memantina (Namzaric®) (FDA, 2017; LIMA, 2008).

Em uma revisão realizada por Petronilho, Pinto e Villar (2011), foram citados os efeitos tóxicos do uso crônico de alguns destes medicamentos, que são classificados como fármacos anticolinesterásicos, além dos seus altos efeitos colaterais. Pelo uso limitado dos medicamentos já existentes para tratar os sintomas da doença de Alzheimer, os autores relatam a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para este fim.

Além disso, os anticolinesterásicos não têm como alvo os achados da DA, que são as placas senis (acúmulo de peptídeo  $\beta$ A) e os emaranhados neurofibrilares (agregados de proteína TAU), tão pouco se relacionam com a hipótese de neuroinflamação e seus eventos subsequentes. Sabendo disso, muitos pesquisadores estão trabalhando para descobrir um tratamento mais eficaz e que possa modificar as principais características encontradas nos cérebros de pacientes acometidos pela doença, porém, um grande número de insucessos vem preocupando a indústria farmacêutica (PEDERSEN & SIGURDSSON, 2015).

#### 1.1.8. Anti-inflamatórios: nova estratégia terapêutica para a DA

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) vêm sendo estudados, principalmente nas últimas décadas, quanto a sua interação com a DA (ROGERS et al, 1993; MCGEER;

SCHULZER; MCGEER, 1996; ANTHONY et al, 2000; BREITNER, 1996; BREITNER et al, 1995; SZEKELY et al, 2004; STEWART et al, 1997; IN T'VELD et al, 2001). Os AINEs são inibidores da enzima ciclo-oxigenase. Os resultados das terapias que utilizam este tipo de droga dependem de suas especificidades com relação às isoformas das enzimas, COX-1 e COX-2 (KAUFMANN et al, 1997).

A eficácia deste tratamento vem sendo testada e muitos benefícios vieram à tona. Acredita-se que os AINEs, quando utilizados a longo prazo, retardam a progressão da DA, amenizam os sintomas típicos da doença e também são capazes de desacelerar o comprometimento cognitivo dos pacientes com DA (RICH et al, 1995).

Em um estudo realizado com cultura de células, AINEs como ibuprofeno, indometacina e sulfeto de sulindaco mostraram ser eficazes em diminuir a produção (80%) de  $\beta$ A 1-42 (WEGGEN et al, 2001).

Estudos *in vivo* utilizando animais demonstraram as várias atividades biológicas dos AINEs frente aos achados da DA. Animais geneticamente modificados, Tg2576, com alta expressão de APP que apresentavam tanto acúmulo de peptídeo  $\beta$ A quanto componentes inflamatórios foram submetidos a um tratamento de seis meses com um AINEs. Os resultados demonstraram uma diminuição significativa de depósitos amiloidais (LIM et al, 2000), bem como, uma melhora nos testes comportamentais dos ratos tratados (LIM et al, 2001). Outro estudo realizado com auxílio de modelos biológicos constatou que 8 dos 20 AINEs testados foram capazes de diminuir a agregação de peptídeo  $\beta$ A 1-42 *in vivo* (ERIKSEN et al, 2003). Além dos AINEs causarem uma resposta biológica positiva sendo administrados a longo prazo, os mesmos também mostraram ser eficazes quando administrados a curto prazo (WEGGEN et al, 2001).

Ainda testando a efetividade dos AINEs em prevenir a DA, In T'veld et al. (2001), acompanhou por aproximadamente sete anos indivíduos saudáveis que faziam, ou não, uso destes medicamentos. Entre os AINEs mais prescritos estavam ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno. Após os sete anos foi atestado que o risco em desenvolver a DA em pacientes que fizeram uso de AINEs a curto prazo era de 0,95%, 0,83% para pacientes que se trataram por médio prazo e impressionantes 0,20% para os indivíduos que utilizaram AINEs por um longo período de tempo, sendo que o risco não variou de acordo com a idade dos pacientes.

Mesmo que muitos estudos já tenham sido feitos para comprovar a eficácia dos AINEs como tratamento da DA, ainda não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual essa droga age. Entretanto, evidências para vários mecanismos vêm sendo sugeridas, e ao que

tudo indica, não somente um, mas uma combinação de diversos efeitos explica os benefícios observados dessa droga. Os mecanismos mais estudados e aceitos são: proteção contra a agregação  $\beta$ A (THOMAS, NADACKAL, THOMAS, 2001; AGDEPPA et al, 2003); e o efeito no processamento da APP (BLASKO et al, 2001; SASTRE et al, 2003).

## 1.2. Produtos naturais

Segundo Barnes, Bloom e Nahin (2008), cerca de 25% das drogas atualmente comercializadas têm em sua composição uma ou mais substâncias extraídas de produtos naturais. O Ministério da Saúde estima que cerca de 80% da população mundial utilize plantas medicinais ou outros compostos naturais para tratar suas enfermidades e/ou suprir as necessidades de assistência médica primária (BRASIL, 2006a).

Simoes & Schenkel (2002) descreveram a relação entre produtos naturais x estudos com tais produtos como paradoxal. Apesar de sabido que o Brasil é um país de vasta biodiversidade, é ainda muito modesto o conhecimento sobre os produtos naturais que essa heterogeneidade biológica pode oferecer. O que acontece no presente momento, é que os brasileiros estão consumindo produtos naturais provenientes de outros países ou continentes que investem na pesquisa e comercialização segura dos mesmos. É preciso então, investir em programas nacionais direcionados a investigações científicas e tecnológicas na área, para que novas moléculas com atividade terapêutica sejam descobertas e desenvolvidas. Faz-se indispensável também, a parceria entre a indústria farmacêutica e a academia, pois é nesse local que serão formados profissionais, principalmente pesquisadores, com uma nova mentalidade, que propõem a utilização dos recursos naturais do seu país, resultando em um crescimento socioeconômico.

A conscientização dessa problemática vem aumentando, e muito, nos últimos tempos. Estudos científicos relacionados a produtos naturais ainda são escassos no Brasil, porém estão gradativamente sendo realizados, visando conhecer a grande variedade de produtos naturais com atividade biológica existentes (BRASIL, 2006a). Apesar dos problemas econômicos do país, medidas vêm sendo tomadas para valorizar a utilização de compostos naturais na área da saúde. Além de muita discussão sobre o assunto, políticas governamentais, tais como a implementação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) nos mostram que os produtos naturais estão finalmente tendo o seu merecido espaço como opção terapêutica no país (BRASIL, 2006b; SILVA et al, 2006; ROSA et al, 2011).

### 1.2.1. Exopolissacarídeos (EPS)

Em meio aos produtos naturais existe uma vasta gama de moléculas com efeitos biológicos promissores que possibilitam a utilização dos mesmos como tratamento de doenças. Entre essas moléculas se destacam os polissacarídeos (CUNHA et al, 2009). Os polissacarídeos são moléculas naturais constituídas por monossacarídeos conectados entre si por ligações glicosídicas. Esses polímeros diferenciam-se, basicamente, pelos monômeros constituintes, tipos de ligação, comprimento da cadeia, números de ramificações e grupos substituintes (NASCIMENTO, 2010).

Em todos os organismos vivos são encontrados polissacarídeos. Como é o caso da celulose e do amido nas plantas e o glicogênio nos animais, os polissacarídeos são encontrados em grande quantidade nos fungos e são de vital importância para todo organismo vivo (GLAZER & NIKAIDO, 2007).

Quando alguns fungos e bactérias produzem polissacarídeos extracelulares, estes produtos passam a ser chamados de exopolissacarídeos (EPS). Muitos dos exopolissacarídeos ainda não foram devidamente estudados e por isso a maioria ainda não foi usada em larga escala na indústria farmacêutica. Porém, alguns desses possuem propriedades tão importantes que já estão sendo utilizados comercialmente, como é o caso da xantana (*Xanthomonas campestris*), dextrana (extraída de *Leuconostoc*, *Streptococcus* ou *Lactobacillus*), curdlana (*Alcaligenes fecalis*) produzidas pelas bactérias mencionadas, e a escleroglucana (gênero *Sclerotium*) e pululana (*Aureobasidium pullulans*), produzidas pelos fungos especificados (BARBOSA et al, 2004).

### 1.2.2. $\beta$ -glucanas

Um grupo que se destaca entre os EPS é o das  $\beta$ -glucanas, que são polissacarídeos de monômeros de D-glicose unidos entre si através de ligações  $\beta$ -glicosídicas. Como forma de fibra dietética, elas são encontradas em uma vasta gama de fontes naturais como em cogumelos, algas, bactérias, leveduras, cevada e aveia (ZHU et al., 2015). A conexão das unidades de D-glicose é geralmente feita por ligações glicosídicas do tipo (1 $\rightarrow$ 3), e com menos frequência por ligações mistas (1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6) (TSIAPALI et al, 2001). As moléculas com ligação (1 $\rightarrow$ 3) são constituídas de aproximadamente 1500 resíduos de glicose, se diferenciando das moléculas com ligação (1 $\rightarrow$ 6) que possuem de 150 a 200. Estas características,

juntamente com a polimerização das moléculas, influenciam no grau de solubilidade destas (LEE et al, 2001).

Com o desenvolvimento de pesquisas médicas durante a última década, as  $\beta$ -glucanas deixaram de ser um mero suplemento alimentar e um “remédio alternativo” para assumir o seu papel merecido na medicina preventiva e de diagnóstico. Como o número de pesquisas relacionadas às propriedades de novas plantas e polissacarídeos microbianos continua a crescer, é preciso agilizar a comercialização destes compostos para competir com produtos tradicionalmente usados. Ali (2009) ainda afirma que as  $\beta$ -glucanas irão sofrer um avanço ainda maior nos próximos anos no que se refere à sua principal promessa, que é a aplicação terapêutica.

O tipo de atividade biológica deste polissacarídeo depende do seu peso molecular e também de sua origem (DU & XU, 2014). Além disso, as diferenças estruturais, como diferentes comprimentos da cadeia polissacarídica, extensão e comprimento das ramificações, podem também influenciar em sua atividade biológica (BAGGIO, 2010).

Muitos são os seus efeitos benéficos para o organismo humano, como imunomodulador e imunoestimulador (ZHAO et al., 2005; PELIZON et al. 2005; WENG et al., 2011; SMIDERLE et al., 2013), anticarcinogênica (SADOVSKAYA et al., 2014), anti-proliferativo (CUNHA et al., 2012), hipoglicemiante e hipocolesterolemiantes (MIRANDA-NANTES et al., 2011), anti-inflamatório (SILVEIRA et al., 2014) entre muitos outros. A  $\beta$ -glucana é considerada também, um agente terapêutico no tratamento de queimaduras (TOKLU et al., 2006) e na cicatrização de feridas (BERDAL et al., 2007).

### 1.2.3. $\beta$ -glucanas e seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes

As  $\beta$ -glucanas, entre os EPS, vêm sendo alvo de muitos estudos por causa da sua bioatividade e pela grande variedade de aplicações médicas que possuem (CHOA et al, 2006). Muitas delas que possuem efeitos terapêuticos são provenientes de fungos, e são também chamadas de moduladores de respostas biológicas, pois são capazes de interagir com a resposta imunológica de seu hospedeiro, modificando-a, promovendo a homeostase podendo prevenir diversas doenças (DIJKGRAAF; HUIJUAN; BUSSEY, 2002). Elas são moduladoras de ambas as respostas imunológicas: inata ou adquirida, podendo, na imunidade adquirida, atuar tanto na imunidade humoral quanto na imunidade celular (DAVIS et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2001; KUBALA et al, 2003;). Como afirmado por Abbas & Lichtman (2005), modificadores de resposta biológica são moléculas

empregadas clinicamente como moduladores da inflamação, imunidade e hematopoese, atuando como ativadores ou supressores de resposta de células do sistema imune como macrófagos e monócitos, neutrófilos, células “*Natural Killer*” (NK), eosinófilos e linfócitos.

No que se diz respeito às muitas atividades das  $\beta$ -glucanas, vale ressaltar sua frequente capacidade de eliminar radicais livres e proteger o organismo contra peroxidação lipídica, aliviando assim as condições inflamatórias (DU & XU, 2014; MIHAILOVIC´ et al, 2013; SALUK-JUSZCZAK; KRÓLEWSKA; WACHOWICZ, 2011; USKOKOVIC´ et al, 2013). O estudo destas atividades biológicas nos sugerem que durante o processo inflamatório elas não só estimulam o sistema imunológico do paciente, mas também se mostram benéficas por conter propriedades antioxidantes. Como foi o caso da pesquisa realizada por Kogan et al. (2005) utilizando um modelo biológico de artrite. Em seus resultados, estes pesquisadores observaram um declínio no nível de carbonilas plasmáticas nos animais, que supostamente foi devido às propriedades de eliminação de radicais livres da  $\beta$ -glucana carboximetilada testada, o que caracteriza a propriedade antioxidante deste composto frente a um modelo inflamatório.

Outros trabalhos também ressaltam a propriedade antioxidante dos EPS, bem como a grande gama de fungos que possuem uma variedade de moléculas sequestradoras de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (DORE, 2006).

Um estudo feito utilizando extrato aquoso de aveia com alta concentração de (1  $\rightarrow$  3,1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucana oriundo da alga *Isochrysis galban* para tratar inflamação induzida pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) mostrou que a glucana estudada é capaz de alterar os parâmetros de estresse oxidativo no plasma de ratos. Os grupos que receberam suplementação de  $\beta$ -glucana em sua dieta mostraram a redução dos níveis de 25-hidroxicolesterol ( $P < 0.001$ ), TBARS ( $P < 0.05$ ) e peróxido lipídicos ( $P < 0.001$ ) (SUCHECKA et al, 2015).

A (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucana proveniente da levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostrou também possuir propriedade antioxidantes ao reduzir os níveis de peroxidação lipídica e radicais livres de plaquetas estimuladas por LPS (SALUK et al, 2013).

Outras pesquisas realizadas em busca da comprovação da existência de atividade antioxidantes de certas glucanas obtiveram resultados favoráveis para essa hipótese. Como foi o caso de estudos realizados por Maity et al. (2015) que analisou (1  $\rightarrow$  3,1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -D-glucana proveniente do cogumelo comestível *Entoloma lividoalbum* (Kühner & Romagn) quanto as suas atividades antioxidantes. Os pesquisadores atestaram que esse polissacarídeo possui atividades antioxidantes promissoras, evidenciadas por suas

hidroxilas, sua atividade eliminadora de radicais superóxido e suas propriedades redutoras de radicais livres. Outra (1 → 3,1 → 6)-β-D-glucana extraída de um cogumelo comestível *Russula albonigra* (Krombh) também demonstrou possuir potentes atividades antioxidantes (NANDI et al, 2014).

A atividade antioxidante das glucana foi comprovada mais uma vez por YUAN et al. (2008) ao testar a glucana proveniente do fungo *Phellinus ribis* em um modelo animal de danos imunológicos decorrente a formação de radicais livres. Os resultados mostraram que a glucana melhorou a função imunológica dos animais através de suas atividades eliminadora de radicais livres e redutora de estresse oxidativo.

#### 1.2.4. β-glucana do *Lasiodiplodia theobromae* MMPI

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI é um anamorfo do fungo *Botryosphaeria rhodina* capaz de produzir EPS do tipo (1 → 6)-β-D-glucana, atualmente denominada lasiodiplodana (VASCONCELOS et al, 2008; CUNHA et al, 2012). Dentre as glucanas proveniente de fungos, a lasiodiplodana é isolada de maneira simples e econômica (KAGIMURA et al, 2014).

As atividades biológicas das β-D glucanas estão intimamente ligadas à sua capacidade de sequestrar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), ou seja, suas atividades antioxidantes (SALUK et al, 2013).

A atividade antioxidante da lasiodiplodana foi relatada por Giese et al. (2014), por ser capaz de eliminar radicais hidroxila e óxido nítrico. Em seu estudo, Kagimura et al. (2015) analisou a (1→6)-β-D-glucana lasiodiplodana quanto as suas propriedades antioxidantes. Além de demonstrar tais efeitos da glucana em seu estado bruto, os autores também atestaram que a modificação química por carboximetilação, aumentou as propriedades antioxidantes deste EPS.

Até hoje nenhum estudo foi divulgado sobre os efeitos desta glucana a nível de sistema nervoso central. Deste modo, o presente trabalho propõe uma pesquisa pioneira com a β-glucana lasiodiplodana a fim de analisar o seu possível efeito profilático frente a um modelo animal de neuroinflamação.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Analisar a possível atividade profilática neuroprotetora da  $\beta$ -glucana lasiodiplodana frente a um modelo animal de neuroinflamação crônica.

### 2.2. Objetivos específicos

- Verificar se a  $\beta$ -glucana lasiodiplodana, é capaz de reverter o quadro amnésico subsequente ao processo neuroinflamatório desencadeado pelo LPS;
- Avaliar o efeito da ingestão sub-crônica da  $\beta$ -glucana lasiodiplodana na atividade locomotora, exploratória e emocional de ratos;
- Analisar a atividade neuroprotetora em função do efeito antioxidante da  $\beta$ -glucana no cérebro de animais neuroinflamados.

## 3. JUSTIFICATIVA

Segundo o relato da *Alzheimer Disease International* (ADI) de 2013, estima-se que 44 milhões de pessoas convivem com algum tipo de demência ao redor do mundo, e prevê-se que este número irá dobrar a cada 20 anos, chegando a 76 milhões em 2030 e a 136 milhões em 2050. Cerca de 60-70% destes casos de demência são relacionadas à doença de Alzheimer. De acordo com Ferri et al. (2005) depois dos 65 anos de idade, a prevalência da doença de Alzheimer duplica-se aproximadamente a cada 5 anos. É esperado que em 2050 a população mundial com mais de 60 anos seja de 2 bilhões (WORLD POPULATION AGEING, 2009). Com número de pessoas idosas aumentando a cada dia, correlacionado com os casos de demência e a alarmante prevalência relacionada a doença de Alzheimer, a Organização Mundial da Saúde – OMS (WHO, 2012) e o G8 UK em 2013 declararam que consideram a doença uma prioridade no âmbito da saúde pública. Em uma declaração feita em 2004, a ADI levantou 10 medidas a serem tomadas com relação a DA. Entre elas

estavam: fornecer tratamento na assistência básica, tornar tratamentos apropriados disponíveis e dar mais suporte as pesquisas. Com base em estudos, muitos artigos como o de Kalra & Khan (2015), Sereniki & Vital (2008), Villegas (20015) confirmaram a necessidade e a urgência de se desenvolver novos fármacos que sirvam para bloquear ou ao menos retardar a evolução da doença de Alzheimer. Artigos de revisão como o de Ehret & Chamberlin (2015) contestam também os medicamentos já aceitos para o tratamento da DA com relação ao período de início e término da terapia e seus modestos efeitos clínicos.

Assumindo a importância de se pesquisar e desenvolver novos medicamentos para a DA, este estudo tem como objetivo analisar um tratamento profilático para a doença utilizando um composto natural e de fácil acessibilidade.

O trabalho realizado por Turmina et al. (2012) analisou a  $\beta(1\rightarrow6)$ -D-glucana lasiodiplodana, produzida pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI, quanto à sua toxicidade em camundongos, a partir de parâmetros bioquímicos, toxicológicos, hematológicos e histopatológicos de órgãos vitais. Averiguou-se que não houve nenhum sinal de toxicidade e letalidade nas cobaias, independente do sexo. Nenhuma alteração foi relatada com relação à histopatologia e hematologia dos camundongos. Estas evidências que comprovam a não toxicidade da  $\beta(1\rightarrow6)$ -D-glucana lasiodiplodana possibilitam a realização de novas pesquisas para testar seus efeitos biológicos em cobaias.

Além disso, por possuir atividade biológicas antioxidante comprovadas, o presente trabalho propõem que a  $\beta(1\rightarrow6)$ -D-glucana lasiodiplodana seja utilizada para tratar profilaticamente a doença de Alzheimer. Os pesquisadores acreditam que a  $\beta$ -glucana em questão seja capaz de proteger o cérebro dos animais do estresse oxidativo e peroxidação lipídica causados pelo Alzheimer, sequestrando os radicais livres formados e amenizando ambos os quadros citados.

Mesmo com todo o avanço conquistado pela ciência e os progressos recentes no que se diz respeito a compreensão dos mecanismos de neurodegeneração típicos da doença de Alzheimer, ainda não se estabeleceu uma terapia eficaz para a doença. Isso se dá, boa parte, pela dificuldade de determinar bons modelos animais para que as novas terapias potenciais possam ser testadas. Não existem, hoje, modelos animais para a doença de Alzheimer que reproduzam exatamente os processos neurodegenerativos subjacentes da doença, cujo acontecimento espontâneo só ocorre em primatas superiores.

Por esse motivo neste projeto, optou-se por utilizar um modelo que mimetiza um quadro de neuroinflamação como um provável agente desencadeador de processos neurodegenerativos da doença de Alzheimer. Utilizando este modelo animal, objetiva-se

obter um potencial candidato a ferramenta terapêutica que possa agir tanto no início do quadro neurodegenerativo, quanto durante a progressão da DA, mesmo em estágios mais avançados, visto que os processos neuroinflamatórios descritos anteriormente estão presentes em todos esses períodos. Este modelo consiste em ratos submetidos a um protocolo de inflamação desencadeada por LPS injetado intraparenquimal, na região CA1 hipocampal, conforme descrito e histopatologicamente validado por Deng Xh et al. (2012). Auss-Wegrzyniak et al. (1998) ainda afirma, que a neuroinflamação crônica induzida por este composto reproduz com bastante eficiência os componentes neurobiológicos da doença de Alzheimer.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **4.1. Animais do experimento**

Para a realização desta pesquisa foram utilizados 84 animais machos da espécie *Rattus Norvegicus*, linhagem wistar, com idade média de 60 dias, pesando entre 200-250 gramas, adquiridos no biotério da PUC (Pontifícia Universidade Católica do Paraná), acondicionados em local apropriado durante todo o estudo.

O alojamento dos animais ocupava uma sala exclusiva com aproximadamente 15 m<sup>2</sup>, no interior do Laboratório de Bioquímica do Exercício e Neurociências (LABEN) coordenado pelo professor Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti, em ambiente sem ruídos, com chão e paredes laváveis para facilitar a limpeza, com ventilação por exaustor, timer para período 12 claro/ 12 escuro e ar condicionado para manutenção de temperatura adequada a espécie (aproximadamente 25°C). Os animais foram alojados em estantes apropriadas, dentro de gaiolas para ratos com base em polipropileno, autoclaváveis, resistente a ácidos, nas medidas de 41x34x16cm que abrigava, no máximo, 3 ratos. Tampa de arame de aço carbono com tratamento de zincagem, malha 7,5mm, além de bebedouro de 500ml específicas para animais de pesquisa. A água e a ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento, exceto durante o treinamento no labirinto octogonal e as 8h que antecedem a eutanásia dos mesmos no final do experimento. O presente projeto foi aprovado pelo CEUA (Comitê de ética no Uso de Animais) da UNICENTRO (Universidade Estadual do Centro-Oeste), dia 17 de novembro de 2015, através do ofício nº 041/2015, parecer 029/2015.

## 4.2. Preparo da $\beta$ -glucana lasiodiplodana

As etapas de produção, recuperação e purificação da  $\beta$ -glucana lasiodiplodana foram baseadas no trabalho realizado por Kagimura et al. (2015).

### 4.2.1. Preparação do inóculo

Em placa de Petri contendo o meio de cultura ágar Sabouraud com cloranfenicol foi semeada uma alçada micelial do fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI isolado de Pinha (*Annona squamosa*). Por 96 horas estas placas foram mantidas a uma temperatura de 28°C em uma estufa bacteriológica. Em frascos Erlenmeyer com 100 mL de meio de sais minerais de Vogel (VOGEL, 1956) e glicose (5 g/L) foram colocados os micélios que cresceram nas placas de Petri. Sob agitação de 150 rpm e temperatura de 28 ° C esses frascos foram cultivados por 48 h. Essa pré-cultura foi homogeneizada por 30 s em um mixer. Após feito isso, o homogenato foi centrifugado e aos micélios recuperados foi adicionado água destilada esterilizada, originando assim uma solução padrão com absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm como descrito por Steluti et al. (2004).

### 4.2.2. Cultivo submerso do fungo e a recuperação do exopolissacarídeo

Para a realização do cultivo submerso foi utilizado um biorreator de bancada (Biostat B, B. Braun International, Alemanha) com termopar para o monitoramento de temperatura. O volume total de trabalho foi de 1 L, mantido a 28 °C, fluxo de ar de 0,8 vvm, 400 rpm de velocidade de agitação da turbina com tempo de cultivo de 72 h. Para ajuste do pH a 5,5 foi adicionado ao meio fermentativo ácido clorídrico 1 mol/L. Volume de 100 mL de inóculo foi adicionado a 900 mL de meio contendo glicose (20 g/L) (CUNHA et al. 2012) e sais de minerais de Vogel (VOGEL, 1956).

Para separação do caldo de cultivo da biomassa a solução foi centrifugada (1500 x durante 30 min.) e então dialisada contra água (4 ° C) utilizando tubos de diálise (1.3 in. MW 11331, da Sigma-Aldrich). Para recuperação do exopolissacarídeo, foi adicionado etanol absoluto ao caldo fermentado e mantido de um dia para o outro em geladeira. O EPS precipitado foi ressuscitado em água destilada a 60 ° C, sob agitação. O EPS resolubilizado foi submetido a intensas diálises contra água destilada (6 dias, com trocas de água 3 vezes ao dia).

### 4.3. Desenho experimental

O número total de ratos, 84, foi dividido em grupos de 12 animais cada, como mostrado a seguir na Tabela 1. Primeiramente os animais foram tratados via gavagem por 28 dias (tratamento sub-crônico). Os ratos dos grupos LPS-SAL e SAL-SAL receberam como tratamento salina (cloreto de sódio 0,9%). Os animais dos grupos LPS-05mg e LPS-10mg receberam 05 e 10mg/kg de lasiodiplodana, enquanto os dos grupos LPS-15mg e SAL-15mg receberam 15mg/kg de lasiodiplodana. Após o período de tratamento todos os ratos passaram por intervenção cirúrgica (estereotaxia, explicada detalhadamente no tópico 4.4), exceto os animais do grupo CONTROLE-TOTAL (CT) que não sofreram nenhum tipo de estresse, e foram gentilmente manipulado por 10min./dia.

**Tabela 1** - Grupos experimentais

Nº	Grupo	Gavagem	Intervenção cirúrgica
1	LPS-SALINA (LPS-SAL)	Salina	LPS
2	LPS-05mg	$\beta$ -glucana lasiodiplodana (05 mg/kg)	LPS
3	LPS-10mg	$\beta$ -glucana lasiodiplodana (10 mg/kg)	LPS
4	LPS-15mg	$\beta$ -glucana lasiodiplodana (15 mg/kg)	LPS
5	SALINA-SALINA (SAL-SAL)	Salina	Salina
6	SALINA-15 mg (SAL-15mg)	$\beta$ -glucana lasiodiplodana (15 mg/kg)	Salina
7	CONTROLE TOTAL (CT)	-	-

### 4.4. Estereotaxia e indução da neuroinflamação

Após os 28 dias de tratamento, os ratos de todos os grupos, exceto do grupo CT, passaram por processo cirúrgico após serem anestesiados com uma solução na proporção de 80 mg/kg de cloridrato de ketamina para 15 mg/kg de cloridrato de xilasina e levados a um aparelho estereotático digital (INSIGHT®), onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores (conforme Figura 5).

Para os animais dos grupos LPS-SAL, LPS-05 mg, LPS-10mg e LPS-15mg a substância LPS (oriundo de *Escherichia coli* 055: B5; Sigma®) foi dissolvida em salina na concentração de 2,5 mg/mL e administrada intra-hipocampo (região CA1) bilateralmente na dose de 10  $\mu$ g / lado, através da infusão de 4  $\mu$ l durante 10 min como preconizado por Souza

(2016). Foram utilizadas as coordenadas para cirurgia estereotáxica de Paxinos e Franklin (2001). Os animais dos grupos SAL-SAL e SAL-15mg foram submetidos ao mesmo procedimento, mas receberam veículo (salina) apenas. Foi utilizada uma bomba de microinjeção, injetando lentamente as substâncias para evitar refluxo durante e após o procedimento (0,2µl/30s.). Após a injeção, a cabeça dos animais foi suturada.



**Figura 5** - Cirurgia estereotáxica para microinjeção bilateral de soluções na região CA1 do hipocampo. Fonte: do autor.

#### 4.5. Testes comportamentais

Para avaliar os possíveis benefícios da lasiodiplodana com relação ao comportamento animal, foram utilizados com todos os grupos experimentais os seguintes labirintos: labirinto em cruz elevado, labirinto de campo aberto, labirinto aquático de Morris e labirinto octogonal. Todos estes testes comportamentais foram feitos uma única vez após o processo cirúrgico de estereotaxia ou então no mesmo momento com o grupo CT.

##### 4.5.1. Tarefas de controle comportamental

Para analisar a atividade exploratória e locomotora dos animais e assegurar que nenhum dos procedimentos realizados (cirurgia estereotáxica, por exemplo) prejudicou o comportamento dos objetos deste estudo, foram realizados testes nos labirintos em cruz elevado e campo aberto como descrito a seguir.

###### 4.5.1.1. Labirinto em cruz elevado

Neste estudo, foi utilizado um labirinto em cruz elevado de madeira, mantido a 50 cm do chão e composto por 4 braços, sendo 2 abertos (BAs) e 2 fechados (BFs), medindo

50 x 10 cm cada e uma arena central de 10 x 10 cm no cruzamento entre os braços (Figura 6). Cada animal foi colocado na arena central com a cabeça voltada para um dos BFs. Quesitos como: número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de permanência nestes braços foram avaliados. Esta tarefa objetiva avaliar o comportamento de ansiedade e anedonia dos animais, deixando-os explorar o equipamento por um período de 5 minutos (PELLOW et al, 1985).



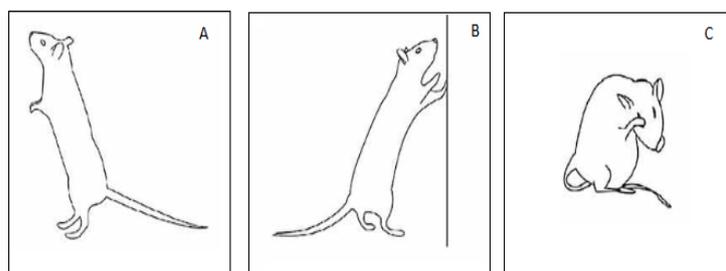
**Figura 6** - Labirinto em cruz elevado. Fonte: do autor.

#### 4.5.1.2. Labirinto de campo aberto: atividade locomotora e exploratória

O labirinto de campo aberto (Figura 07) foi utilizado primeiramente para avaliar a atividade locomotora dos animais. O Campo aberto consiste em uma caixa arredondada de material acrílico com base divisória em formato de campo. A base possui 100 cm x 100 cm, sendo dividida em 12 quadrantes. As dimensões do aparelho são: 50 cm de altura por 90 cm de diâmetro. Por ser de material acrílico, este labirinto permite total visualização do comportamento do animal. Cada rato foi gentilmente colocado neste equipamento, com a face virada para um dos vértices do piso e deixado explorar por um período de 5 minutos. Esta tarefa teve como objetivo avaliar as alterações da atividade locomotora, exploratória e sugerir uma correlação a distúrbios emocionais como medo e ansiedade nos diferentes grupos de animais. Parâmetros como: o ato de defecar (nº de fezes), locomoção horizontal/cruzamentos (número de passagens do animal sobre as linhas marcadas no chão), atividades verticais (ações de *rearing* e *leaning* – figura 7A e 7B), *face grooming* (ato de higienização da pelagem – figura 7C), *freezing* (tempo que o animal permanece imóvel) foram contabilizados e analisados durante o tempo de 5 minutos em que os animais ficaram dentro do labirinto (BARROS et al, 2001).



**Figura 7** - Labirinto de campo aberto – análise locomotora e exploratória. Fonte: do autor.



**Figura 8** - Parâmetros comportamentais avaliados durante a tarefa de campo aberto. A) *Rearing*; B) *Leaning* e C) *Face grooming*. Fonte: do autor.

#### 4.5.2. Tarefas para avaliação de memória

##### 4.5.2.1. Labirinto de campo aberto: reconhecimento de objeto

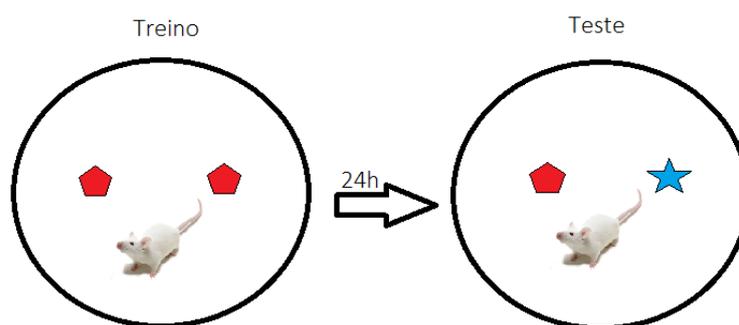
O labirinto de campo aberto (já descrito no item 4.5.1.2.) foi novamente utilizado para a tarefa de reconhecimento de objeto, protocolo descrito por Bevins & Besheer (2006). Para este teste de memória são necessários 3 dias de experimento. No primeiro dia os animais são gentilmente colocados no centro do labirinto, permanecendo nele por 10 min. Este dia caracteriza-se como uma habituação ao ambiente. No segundo dia os animais são novamente colocados no aparato, onde agora há dois objetos idênticos em seu interior (sessão de treino). Neste momento os animais são deixados no labirinto por 5 min. para que possam explorar os objetos apresentados. 24hh depois, no terceiro dia, um dos objetos é substituído por um objeto novo (sessão de teste), como mostra a Figura 09 e a imagem ilustrativa 10. Entre uma

sessão e outra o aparato e os objetos lá dispostos foram limpos com álcool 70% para evitar pistas olfativas.

Durante ambas as sessões (treino e teste), foram determinados os tempos de exploração do animal com os objetos, sendo considerado exploração quando o animal fica com o focinho no mínimo 0,5 cm do objeto. O índice de discriminação foi então calculado pelo tempo total de exploração do objeto novo, dividido pelo tempo de exploração de ambos os objetos, e usado como um parâmetro cognitivo  $[T \text{ obj. novo (B)}/T \text{ obj. novo (B) + T \text{ obj. familiar (A)}]$ . O intuito desta tarefa é analisar o tempo dispendido pelos animais explorando os objetos. Os ratos são exploradores por natureza, portanto, o tempo de exploração do objeto novo é proporcional a capacidade destes animais de recordar que antes aquele objeto não estava lá.



**Figura 9** - Labirinto de campo aberto – tarefa de reconhecimento de objeto. Fonte: do autor.

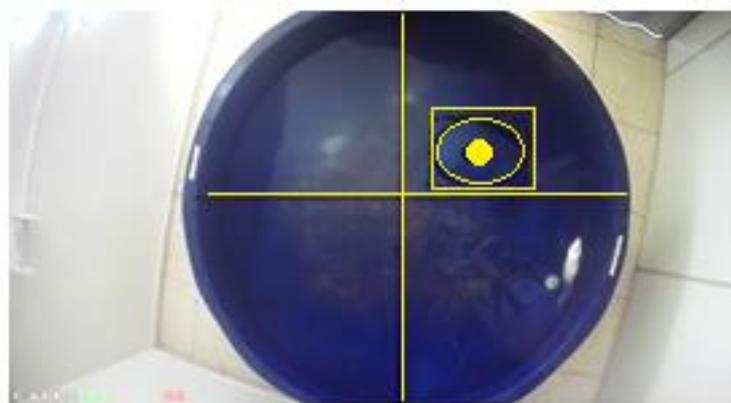


**Figura 10** - Imagem ilustrativa da tarefa de reconhecimento de objeto realizada no labirinto de campo aberto. Fonte: do autor.

#### 4.5.2.2. Labirinto aquático de Morris

O labirinto aquático de Morris, ou, *Morris Water Maze*, é uma tarefa comportamental que visa avaliar a memória espacial e os processos mnemônicos de ratos. O aparato consiste

de uma piscina que mede 150 centímetros de diâmetro com profundidade de 50cm. O mesmo se encontra em uma sala, livre de ruídos e odores, em que nas paredes encontram-se dicas visuais que têm a finalidade de guiar o animal a plataforma de escape. Durante o treino, essa plataforma encontra-se submersa a 3 cm do nível da água. O treino consiste em 8 *trials* (largadas) por rato, durante 5 dias. A piscina é digitalmente dividida em quadrantes: Nortes, Sul, Leste e Oeste (Figura 11). Em cada *trial* o animal é gentilmente colocado, randomicamente, em um dos quadrantes. Durante a fase de treino os animais têm 5 min. para encontrar a plataforma de escape, e caso isso não ocorra, o pesquisador guia-o até a mesma e deixa-o lá por 30 s antes de começar o próximo *trial*. 24 h após o último dia de treino, os animais são submetidos a um *trial* teste que tem como tempo máximo 1 min e 30 s. Neste momento a plataforma é retirada do aparato. Os parâmetros: tempo de latência (L) – tempo que o animal demora para encontrar o local onde estava a plataforma; número de cruzamentos (C) – número de vezes que o animal passou pelo local onde estava a plataforma; tempo de permanência (P) – tempo que o animal despendeu no quadrante alvo (quadrante onde se encontrava a plataforma) foram analisados neste momento. Esta tarefa permite o estudo da aprendizagem/memória espacial e de processos mnemônicos considerados dependentes do hipocampo. (BONINI, et al, 2007; BROMLEY-BRITS et al, 2011; SILVA et al, 2012;).



**Figura 11** - Labirinto Aquático de Morris – Divisão virtual dos quadrantes. Fonte: do autor.

#### 4.5.2.3. Labirinto octogonal

O labirinto octogonal (*Radial Maze* ou então labirinto radial de 8 braços), possui uma plataforma central de 20 centímetros de diâmetro. A esta plataforma, ligam-se 8 braços, cada um com 180 x 109 x 470mm (altura x largura x comprimento), como demonstrado na Figura 12. O aparelho é monitorado por sensores e as portas são acionadas por motor elétrico.



**Figura 12** - Labirinto Octogonal. Fonte: do autor.

A tarefa utilizada para avaliar a memória dos animais nesse aparato segue o protocolo estabelecido por Pirchl, Kemmler, Humpe (2010) com adaptações. O procedimento teve, ao todo, 10 dias de duração, como resumido na figura 12. Neste período os animais foram submetidos a privação de alimento, com restrição de 2 g de ração por animal por dia nas caixas moradias. Os animais alcançaram aproximadamente 80-85% do seu peso ao final do 10º dia. Os braços 1, 4, 5 e 7 do labirinto tinham sinais visuais pequenos acima de suas portas e maiores na parede no final dos respectivos braços (triângulo, barras verticais, “X” e um quadrado), como mostra a Figura 13. Os 10 dias de procedimento foram realizados da seguinte forma (Figura 14):

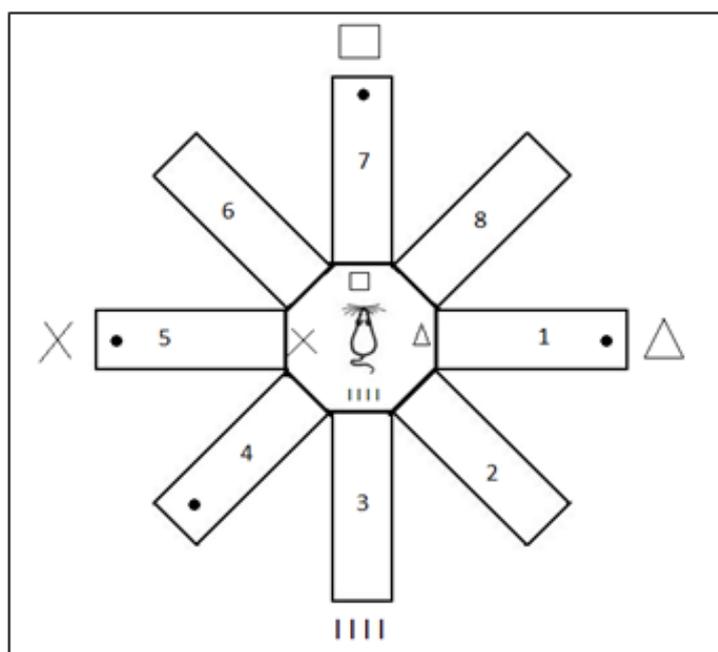
**Dia 01 e 02:** Somente privação de alimento.

**Dia 03:** Os animais começaram a fase de habituação e treinamento no labirinto. Cada rato foi submetido a 4 corridas diferentes:

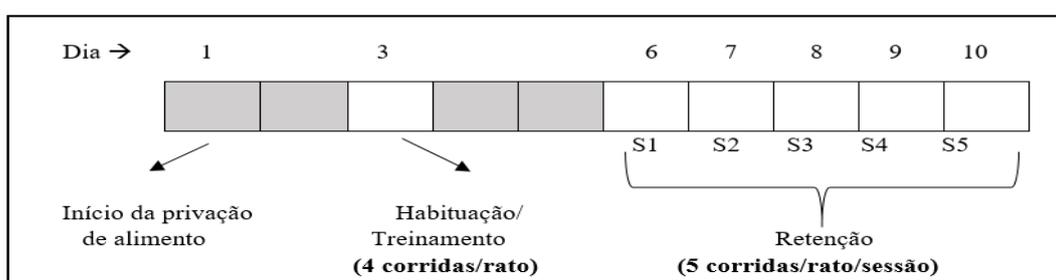
- I. As portas de todos os braços permaneceram abertas e os braços continham recompensas em suas extremidades;
- II. As portas abriam e fechavam a cada 5 min., ainda todos os braços continham recompensa em suas extremidades;
- III. Somente as portas dos braços 1, 4, 5 e 7 permaneciam abertas e com recompensa em suas extremidades;
- IV. Somente os braços 1, 4, 5 e 7 tinham recompensa em suas extremidades, porém, agora todas as portas permaneciam abertas.

Cada corrida chegava ao fim no momento em que o animal encontra todas as recompensas a ele oferecidas, ou então, após 10 min.

**Dia 06 - 10:** Durante estes dias os animais passaram pela fase de retenção. Todos os animais foram submetidos a 5 corridas idênticas diariamente. Nestas corridas somente os braços 1, 4, 5 e 7 possuíam recompensa em suas extremidades; os ratos eram colocados no centro do labirinto com todas as portas fechadas; após 10 s todas as portas se abriam; depois da entrada do animal em um braço, os demais se fechavam; após o retorno do animal ao centro, todos os braços fechavam e assim sucessivamente. Cada corrida chegava ao fim quando o animal ingerisse todas as recompensas a ele fornecidas, ou, após 10 min. Antes de toda corrida o interior do aparato foi limpo com álcool 70% para evitar pistas olfativas.



**Figura 13** - Dicas visuais expostas acima das portas do labirinto octogonal e nas paredes que cercam o aparato. Fonte: do autor.



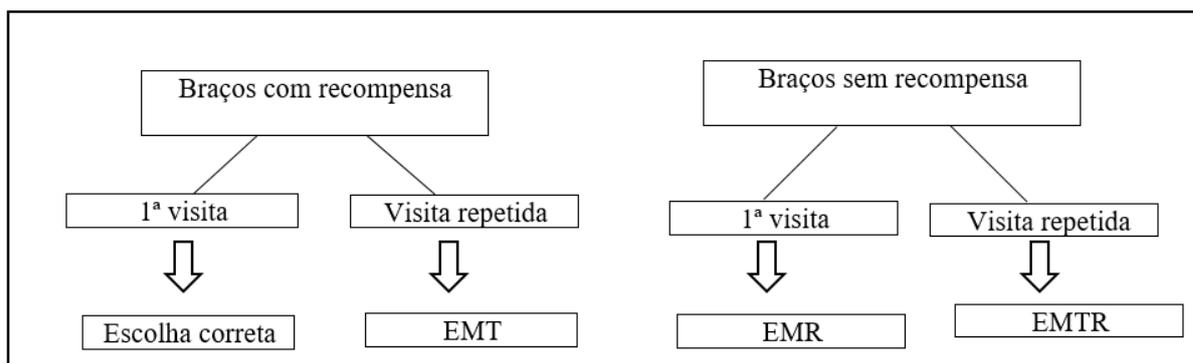
**Figura 14** - Protocolo da tarefa de avaliação de memória no labirinto octogonal (S1-S5: sessões 1-5; quadrantes cinza: dias sem nenhuma corrida). Fonte: do autor.

A avaliação dos erros cometidos pelos animais no labirinto octogonal baseou-se na definição de erro de memória de trabalho e de erro de memória de referência proposto por Jarrard et al. (1984), como exposto na Figura 15. Resumidamente, se a primeira visita do animal fosse em um braço que continha recompensa (1, 4, 5 e 7) a mesma seria considerada uma escolha certa (acerto), já se a primeira visita fosse em um braço sem recompensa (2, 3, 6 e 8), essa seria definida como um erro de memória de referência (EMR). Além disso, visitas repetidas nos braços onde estavam as recompensas foram classificadas como erro de memória de trabalho (EMT), enquanto visitas repetidas nos braços que nunca tiveram recompensas foram chamadas de erro de memória de trabalho-referência (EMTR). Outro parâmetro avaliado foi a porcentagem de acertos (% acertos), o qual foi calculado pela fórmula a seguir:

$$\frac{\text{Recompensas encontradas}}{\text{Visitas}} \times \frac{\text{Recompensas} \times 100}{4}$$

Por exemplo, se um animal encontrasse as 4 recompensas sem cometer nenhum erro, o mesmo alcançaria 100% de escolhas corretas [  $(4/4) \times (4 \times 100/4)$  ]. Por outro lado, se um animal encontrasse 3 recompensas e não cometesse nenhum erro, ele atingiria o total de 75% de escolhas corretas [  $(3/3) \times (3 \times 100/4)$  ].

Em todos os casos supracitados, uma visita a um dos braços do labirinto só era considerada como tal, se o animal chegasse até a parte distal do braço, onde o recipiente de recompensas está localizado.



**Figura 15** - Definição de erro no labirinto octogonal. EMT: Erro de memória de trabalho; EMR: Erro de memória de referência; EMTR: Erro de memória de trabalho-referência. Fonte: do autor.

#### 4.6. Eutanásia e coleta de amostras biológicas

Os ratos foram anestesiados e depois de verificado o estado anestésico foram eutanasiados, por decapitação. Logo após foi realizada a retirada do encéfalo e então, hipocampo de todos os animais. A porção esquerda do cérebro, mais especificamente a porção esquerda do hipocampo foi colocada em Tris/HCl 30 mM pH 7.4 para posterior análise de TBARS. O hemisfério direito foi armazenado em PBS (tampão fosfato salino) para análise de Nitrato/nitrito.

#### 4.7. Análises laboratoriais

##### 4.7.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A partir de um estado de estresse oxidativo no organismo, um dos eventos mais comuns é a peroxidação de estruturas lipídicas pelo excesso de espécies reativas (radicais livres) formadas. Esses hidroperóxidos de lipídios são metabolizados pela célula, formando em sua maioria, aldeídos. Dentre os diversos metabólitos desses lipídios, o malonildialdeído (MDA) é o metabólito formado em maior abundância. Através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), estruturas aldeídicas, como MDA, formam um produto colorido (rosado), mensurável através de espectrofotometria. Desta forma, para quantificação de TBARS nas amostras de tecido cerebral dos animais do presente estudo foi utilizado a técnica de Ohkawa et al. (1979) com alterações.

A preparação do homogeneizado consiste em remover o hipocampo, homogeneizar em Tris HCl 30 mM, pH 7,4 na proporção 1:5 (peso/volume) com homogeneizador/emulsificador tipo turrax (MA102 – New Química®) e centrifugar para obter o sobrenadante límpido. Do homogeneizado, retirar 200 µL de amostra e adicionar 200 µL de BHT 80 µM (di-terc-butil metil fenol) e utilizar o homogeneizador/emulsificador o homogeneizador/emulsificador para homogeneizar. Separadamente é necessário preparar o sistema que é composto de: 800 µL de TBA 0.8 %, (ácido tiobarbitúrico) 800 µL de ácido acético, 320 µL de SDS 8.1% (docecil sulfato de sódio) e 160 µL de água destilada (volume suficiente para análise de uma amostra). Como padrão fora utilizada o MDA 0,3 mM (1,1,3,3-Tetrametoxipropano). No tubo reacional foram colocados a amostra previamente preparada como citado acima, água e o sistema. Os tubos foram deixados em banho maria

(Q218- Quimis®) a 100°C por 1h. Feito isso, resfriou-se com água corrente e com auxílio de cubetas de vidro foi realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro (V-1100D - Proanalise®) em um comprimento de onda de 544nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g tecido.

#### 4.7.2. Óxido nítrico (NO)

O oxido nítrico (NO) é um radical livre formado a partir da metabolização da L-arginina pela ativação da enzima oxido nítrico sintetase (NOS). Por conta da meia vida do NO ser extremamente curta (10 a 60 s nos tecidos) e sua concentração ínfima, uma forma indireta de dosar esse radical é através da dosagem de nitrato e nitrito (produtos da reação do NO com o oxigênio) (ARCHERS, 1993). Para esta análise foi usado um kit próprio para análises laboratoriais de cunho experimental, Cayman Chemical®. O kit consiste na mensuração da concentração total de nitrato/nitrato nas amostras por método colorimétrico. A primeira etapa fundamenta-se na conversão de nitrato a nitrito utilizando a enzima nitrato redutase. Feito isso é adicionado o reagente de Griess, o qual converte o nitrato em um cromóforo de cor púrpura intenso. Os resultados foram lidos em espectrofotômetro (SPECTROMAX100 - Molecular Devices®), a 540 nm.

#### 4.8. Análise estatística

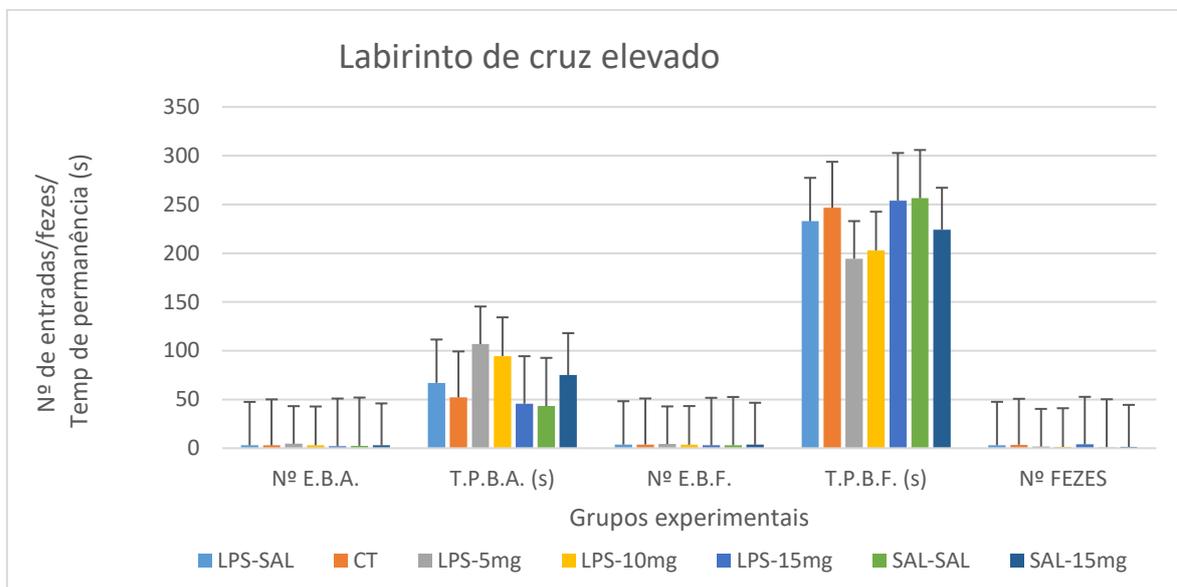
Os dados foram organizados em planilhas de Microsoft Office Excel 2016® e os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS para *Windows*. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA com 95% de confiança e com post hoc de Tukey (significância de  $P < 0,05$ ), entre os resultados dos sete grupos de estudo.

## 5. RESULTADOS

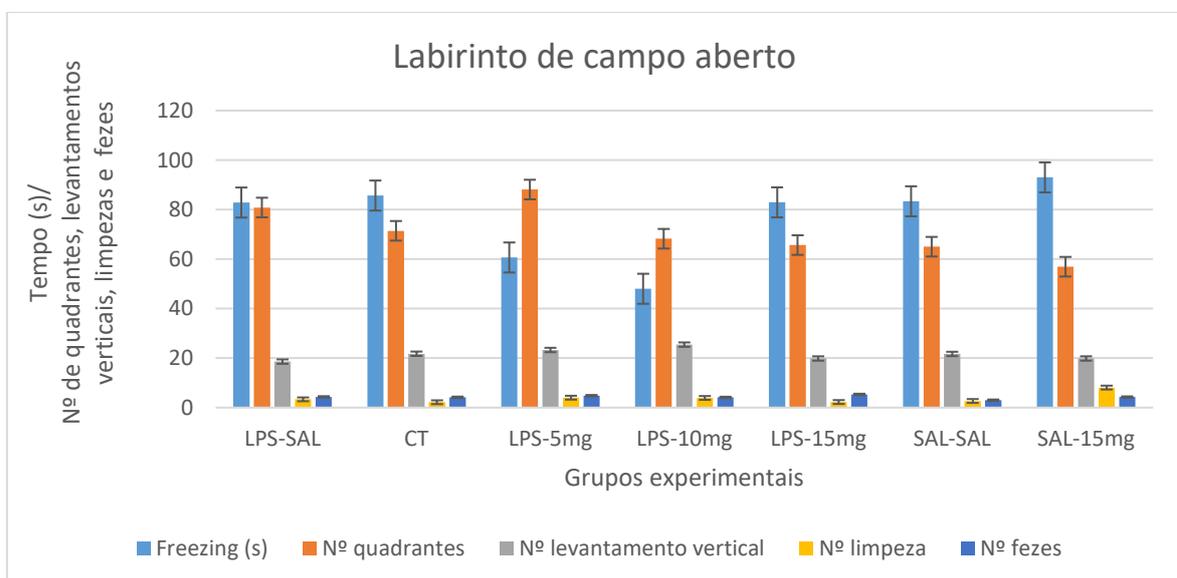
### 5.1. Tarefas de controle comportamental

Os dados encontrados nos testes de cruz elevado e campo aberto foram comparados entre os grupos para verificar qualquer interferência relacionada a atividade exploratória e a

emoção dos animais que pudesse interferir nos resultados comportamentais de avaliação de memória. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas tarefas de controle comportamental entre os grupos como mostram os gráficos abaixo (Figuras 16 e 17).



**Figura 16** - Comparação dos parâmetros avaliados na tarefa de controle comportamental no labirinto de cruz elevado. Os valores estão dispostos em média  $\pm$  EPM ( $n = 10-12$ ). N° E.B.A. = Número de entradas nos braços abertos; T.P.B.A.= Tempo de permanência nos braços abertos; N° E.B.F.= Número de entradas nos braços fechados; T.P.B.F. = Tempo de permanência nos braços fechados; N° fezes = Número de fezes.



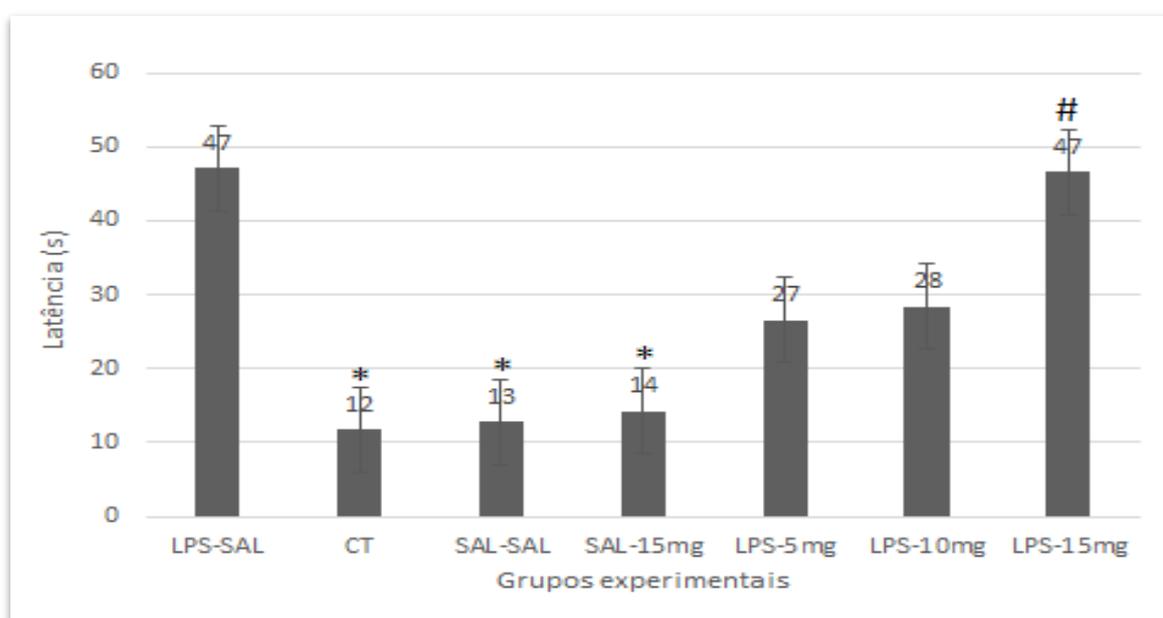
**Figura 17** - Comparação dos parâmetros avaliados na tarefa de controle comportamental no labirinto de campo aberto. Os valores estão dispostos em média  $\pm$  EPM ( $n = 10-12$ ).

## 5.2. Tarefas para avaliação de memória

### 5.2.1. Labirinto aquático de Morris

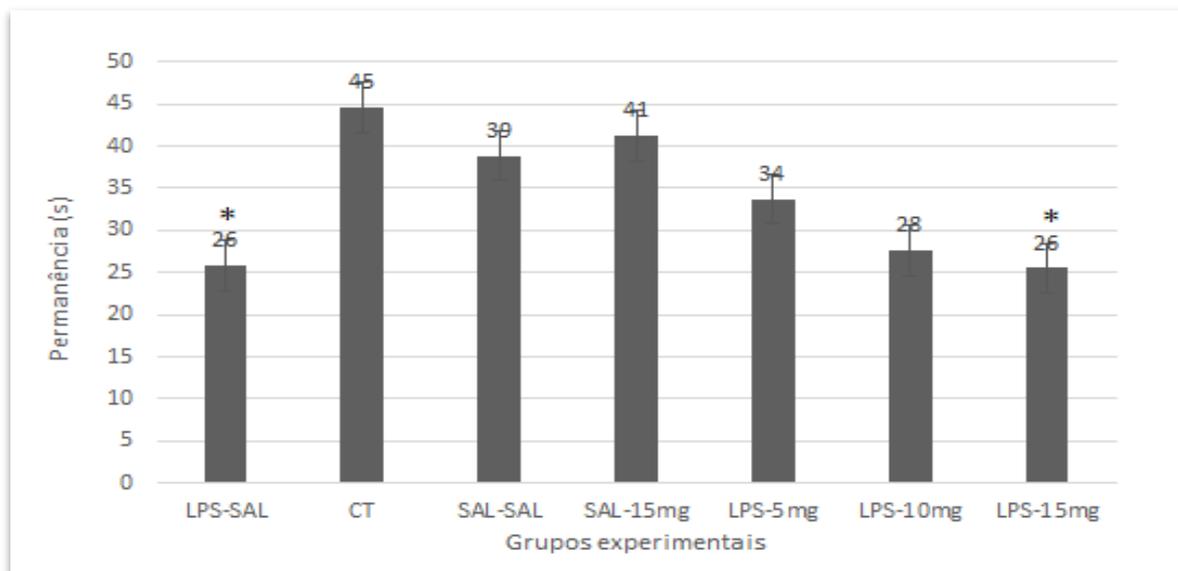
Os dados referentes ao dia do teste dos ratos no Labirinto Aquático de Morris, estão dispostos nas Figuras 18, 19 e 20.

Foi possível observar que o tempo de latência dos animais dos grupos CT, SAL-SAL e SAL-15mg foi significativamente ( $P < 0,04$ ) menor que o tempo dos ratos do grupo LPS-SAL ou seja, os animais levaram menos tempo para chegar ao local onde antes estava a plataforma. Já os animais do grupo tratado LPS-15mg tiveram maior tempo de latência quando comparados com os grupos CT e SAL-SAL ( $P < 0,03$ ).



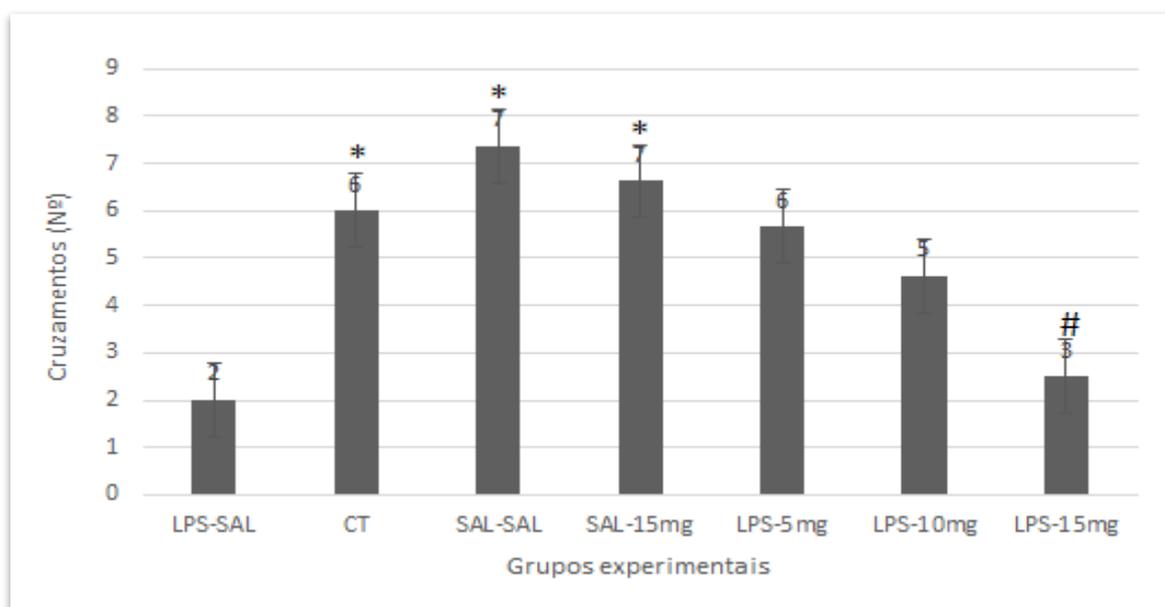
**Figura 18** - Comparação do tempo de latência avaliado na tarefa realizada no Labirinto Aquático de Morris. Os valores estão dispostos em média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ ), em segundos (s). \* $P < 0,04$ ; Teste Tukey comparando com o grupo LPS-SAL. # $P < 0,03$ ; Teste Tukey comparando com os grupos CT e SAL-SAL.

Para o parâmetro tempo de permanência, que se refere ao tempo que os animais dispõem no quadrante alvo (onde antes se encontrava a plataforma de escape), o grupo LPS-SAL e novamente o grupo tratado LPS-15mg obtiveram tempo significativamente ( $P < 0,04$ ) menor quando comparados ao grupo CT.



**Figura 19** - Comparação do tempo de permanência avaliado na tarefa realizada no Labirinto Aquático de Morris. Os valores estão dispostos em média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ ), em segundos (s). \* $P < 0,04$ ; Teste Tukey comparando com o grupo CT.

O número de cruzamentos foi também contabilizado e mostrou-se significativamente maior ( $P < 0,04$ ) para os grupos CT, SAL-SAL e SAL-15mg comparando-os com o grupo LPS-SAL. O grupo que recebeu 15 mg/kg de  $\beta$ -glucana, LPS-15mg, obteve um número significativamente menor ( $P < 0,03$ ) de cruzamentos quando comparado com o grupo SAL-SAL e SAL-15mg.



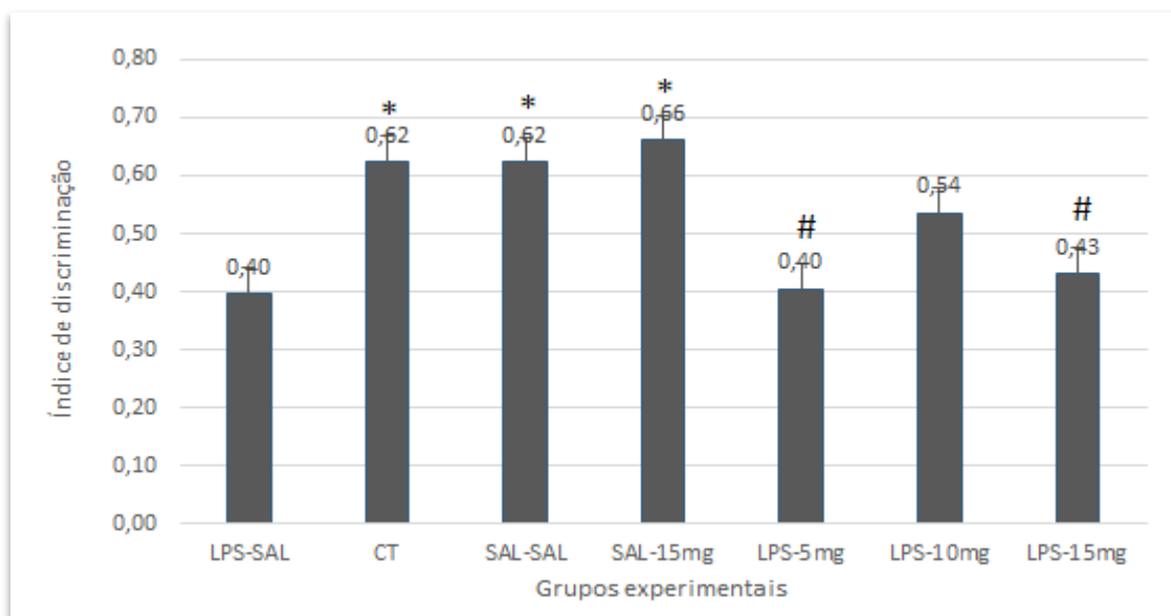
**Figura 20** - Comparação do tempo de cruzamentos avaliado na tarefa realizada no Labirinto Aquático de Morris. Os valores estão dispostos em média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ ), em nº de cruzamentos. \* $P < 0,04$ ; Teste Tukey comparando com o grupo LPS-SAL. # $P < 0,03$ ; Teste Tukey comparando com o grupo SAL-SAL e SAL-15mg.

No que se diz respeito as demais doses, 05 e 10 mg/kg, não houve diferença significativa entre os grupos, porém, pode-se observar uma tendência nos parâmetros latência e cruzamento em se aproximarem dos valores obtidos pelos grupos CT, SAL-SAL e SAL-15mg.

### 5.2.2. Campo aberto – reconhecimento de objeto

Os resultados da tarefa de reconhecimento de objeto aplicada nos grupos experimentais do presente estudo estão dispostos na Figura 21.

Foi possível observar que houve diferença significativa ( $P < 0,001$ ) entre os grupos CT, SAL-SAL e SAL-15mg quando comparados com o grupo LPS-SAL, a favor dos primeiros grupos. Já os grupos tratados, LPS-5mg e LPS-15mg tiveram um índice de discriminação significativamente menor ( $P < 0,01$ ) do que os grupos saudáveis CT, SAL-SAL e SAL-15mg. O grupo de dose intermediária, LPS-10mg, não foi significativamente diferente dos demais grupos, porém, é possível observar uma tendência nos resultados ao se aproximarem dos grupos controle: CT, SAL-SAL e SAL-15mg.



**Figura 21** - Comparação dos valores de índice de discriminação na tarefa de reconhecimento de objeto. Os valores estão dispostos em média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). \* $P < 0,001$ ; Teste Tukey, comparando com o grupo LPS-SAL. # $P < 0,01$ ; Teste Tukey, comparando com os grupos CT, SAL-SAL e SAL-15mg.

## 5.2.3. Labirinto octogonal

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os animais dos grupos LPS-SAL e CONTROLE-TOTAL com relação a tarefa no Labirinto Octogonal. Os resultados estão dispostos na tabela a seguir (Tabela 02).

**Tabela 2** - Comparação dos valores obtidos dos cinco parâmetros avaliados no Labirinto Octogonal entre os grupos na 10ª sessão de retenção

<i>Parâmetros avaliados no Labirinto Octogonal</i>	<b>Grupos LPS-SAL</b>	<b>Grupo CT</b>
<i>Acertos</i>	4,28 ± 0,18 <sup>a</sup>	4,28 ± 0,28 <sup>a</sup>
<i>% de acertos</i>	76,53 ± 8,87 <sup>a</sup>	79,34 ± 1,87 <sup>a</sup>
<i>EMT</i>	3,28 ± 0,52 <sup>a</sup>	2,14 ± 1,12 <sup>a</sup>
<i>EMR</i>	0,71 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,20 <sup>a</sup>
<i>EMTR</i>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

% de acertos = porcentagem de acertos; EMT= Erro de memória de trabalho; EMR= Erro de memória de referência; e EMTR= Erro de memória de trabalho-referência. Os valores estão dispostos em média ± EPM ( $n = 7$ ) obtidos através do Test t não pareado. Letras diferentes são significativamente diferentes entre si.

É importante notar que, ambos os grupos obtiveram diferença significativa nos valores dos parâmetros avaliados no teste do labirinto octogonal quando comparamos o primeiro dia de treinamento com o último (Tabela 3).

**Tabela 3** - Comparação dos valores obtidos dos cinco parâmetros avaliados na tarefa no Labirinto Octogonal do mesmo grupo no primeiro e no último dia do teste de retenção.

<i>Parâmetros avaliados no Labirinto Octogonal</i>	<b>Grupos LPS-SAL</b>		<b>Grupo CT</b>	
	1º dia	5º dia	1º dia	5º dia
<i>Acertos</i>	1,86 ± ,34	4,29 ± ,18 <sup>@</sup>	3,00 ± ,31	4,29 ± ,29*
<i>% de acertos</i>	42,41 ± 4,28	79,34 ± 1,87 <sup>@</sup>	41,17 ± 3,73	76,53 ± 8,87*
<i>EMT</i>	9,71 ± 1,69	3,29 ± ,52 <sup>#</sup>	7,00 ± 3,73	2,14 ± 1,12*
<i>EMR</i>	3,14 ± ,34	0,71 ± ,18 <sup>@</sup>	1,86 ± ,34	0,71 ± ,29
<i>EMTR</i>	7,43 ± 2,08	0,00 ± ,00 <sup>#</sup>	3,71 ± ,97	0,00 ± ,00 <sup>#</sup>

% de acertos = porcentagem de acertos; EMT= Erro de memória de trabalho; EMR= Erro de memória de referência; e EMTR= Erro de memória de trabalho-referência. Os valores estão dispostos em média ± EPM ( $n = 7$ ) obtidos através do Test t pareado. \* $P < 0,02$ ; # $P < 0,01$ ; @ $P < 0,0001$ , comparando com a média do primeiro dia.

Por essa razão, esta tarefa não foi utilizada para avaliar a memória dos demais grupos, uma vez que o grupo neuroinflamado (LPS-SAL) conseguiu realiza-la com sucesso.

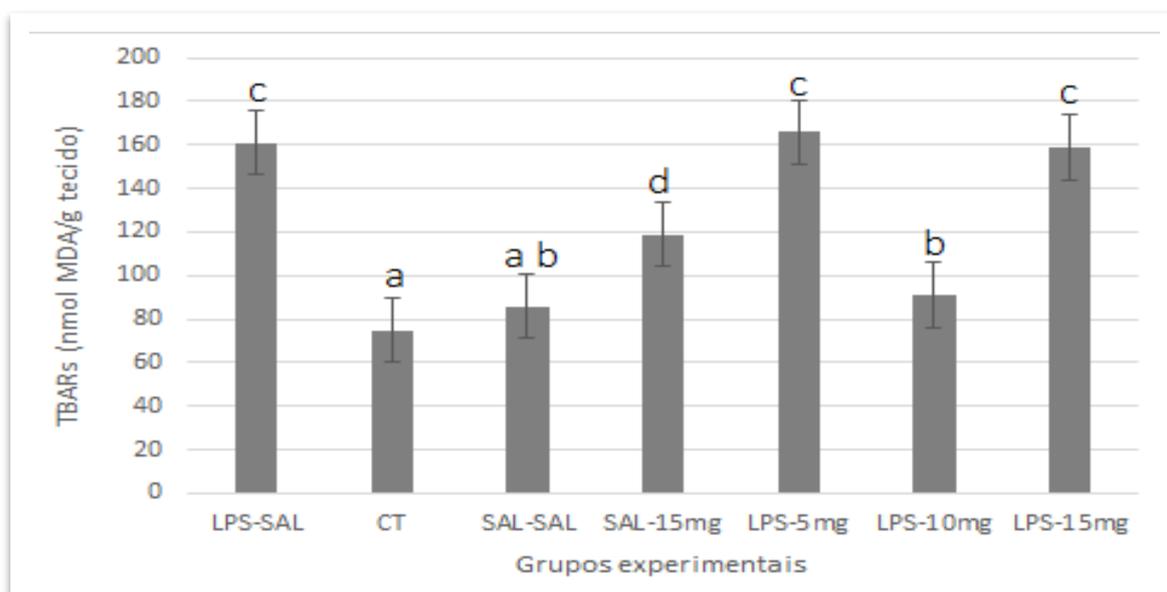
### 5.3. Análises laboratoriais

#### 5.3.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)

O resultado da análise quantitativa de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) estão dispostos na Figura 22.

Pode-se observar que o nível de TBARs para os grupos CT e SAL-SAL foram semelhantes entre si. Já o grupo LPS-SAL demonstrou níveis mais altos destas substâncias quando comparado com os grupos controle, CT, SAL-SAL e SAL-15mg. O grupo SAL-15mg demonstrou ser diferente de todos os grupos do presente estudo.

Ao que se diz respeito aos grupos tratados com a  $\beta$ -glucana lasiodiplodana, ambos os grupos de maior e menor dose (LPS-5mg e LPS-15mg) tiveram o nível de TBARs semelhante ao do grupo LPS-SAL. Por outro lado, o grupo LPS-10mg atingiu níveis de TBARs similares ao grupo controle SAL-SAL, porém não teve níveis semelhantes ao grupo CT.

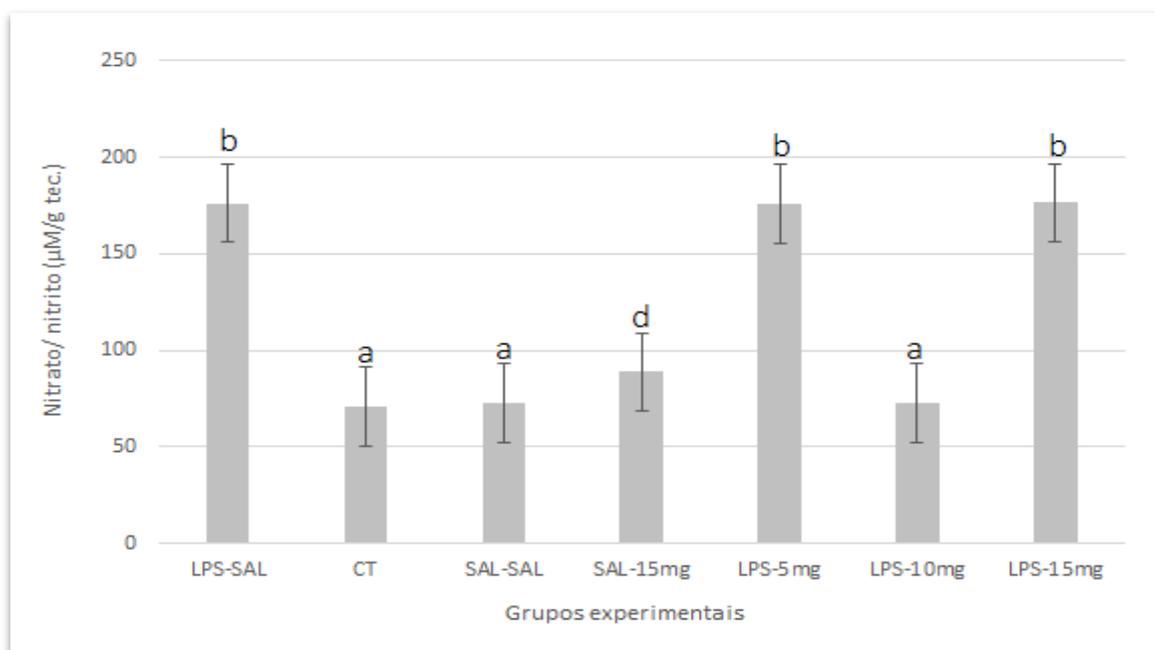


**Figura 22** - Alteração nos níveis de TBARs no hipocampo de ratos. Os valores estão dispostos em média  $\pm$  EPM ( $n = 11-12$ ), teste Tukey. Letras diferentes são significativamente diferentes entre si ( $P < 0,01$ ).

### 5.3.2. Nitrato/nitrito

Os níveis de nitrato/nitrito analisados no córtex cerebral dos animais do presente estudo estão dispostos na Figura 23.

Foi possível observar que os níveis de nitrato/nitrito dos grupos tratados, LPS-5mg e LPS-15mg, foram similares aos do grupo LPS-SAL. Já o grupo com dose intermediária, LPS-10mg, obteve níveis de nitrato/nitrito semelhante aos dos grupos controle, CT e SAL-SAL. Já o grupo controle que recebeu a dose mais alta de  $\beta$ -glucana, SAL-15mg, demonstrou resultados diferentes de todos os grupos.



**Figura 23** - Alteração nos níveis de Nitrato/nitrito no córtex cerebral de ratos. Os valores estão dispostos em média  $\pm$  EPM ( $n = 11-12$ ), Teste Tukey. Letras diferentes são significativamente diferentes entre si ( $P < 0,0001$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados dos testes realizados para controle comportamental foram satisfatórios pelo fato de não haver diferença significativa em nenhum parâmetro avaliado comparando os grupos experimentais. Isso demonstra que os animais de todos os grupos apresentaram o mesmo status emocional (analisado no labirinto de cruz elevado), e não apresentaram prejuízo em suas atividades exploratória e locomotora (analisadas no labirinto de campo aberto). Se um ou mais grupos apresentasse resultado diferente dos demais, o mesmo poderia ser julgado como um interferente e influenciar negativamente os resultados das tarefas de

avaliação de memória e aprendizagem (ASHWELL, 1987; LEE & RABE, 1992; LLORENS et al, 1993).

Sobre as análises de dano oxidativo, observou-se que o nível de TBARs do grupo LPS-SAL foi maior do que o nível dos grupos controle, CT, SAL-SAL e SAL-15mg ( $P<0,01$ ). Como o TBARs é um marcador de peroxidação lipídica, é possível supor que a neuroinflamação acarretada pela administração de LPS causou este quadro no cérebro dos ratos. Este mesmo parâmetro se mostrou aumentado em outros estudos, corroborando com os achados do presente trabalho (ABARESHI et al, 2016).

Os ratos saudáveis que receberam 15 mg/kg de lasiodiplodana tiveram seus níveis de nitrato/nitrito e TBARs diferentes dos demais grupos saudáveis, CT e SAL-SAL ( $P<0,0001$  e  $P<0,01$  respectivamente). Estes resultados sugerem que radicais livres foram formados em excesso no cérebro destes animais. Os níveis destes parâmetros não se equipararam aos encontrados no grupo neuroinflamado (LPS-SAL), portanto, não há evidências de que a dose de 15 mg/kg esteja ocasionando um quadro de peroxidação lipídica e/ou estresse oxidativo cerebral, porém, não se pode descartar a hipótese de que a lasiodiplodana nesta concentração esteja dando início a um processo tóxico.

O efeito toxicológico *in vivo* da administração via gavagem de 50 mg/kg de lasiodiplodana foi testado por Túrmina et al (2012) com relações a parâmetros hematológicos e histopatológicos (sendo analisadas lâminas histológicas de fígado, coração, rim e baço). Este estudo demonstrou que a  $\beta$ -glucana não ocasionou alterações em nenhuma análise realizada em camundongos independente de gênero. Nenhum teste bioquímicos ou histopatológico foi realizado para verificar o efeito da administração de altas concentrações de lasiodiplodana no cérebro dos animais, impossibilitando a elucidação da consequência dessa administração a nível de sistema nervoso central. Portanto, novos testes toxicológicos são necessários para testar e analisar com maior precisão, se a concentração de 15 mg/kg de lasiodiplodana pode mesmo causar este efeito *in vivo*.

Ao que se diz respeito aos grupos neuroinflamados tratados com a  $\beta$ -glucana lasiodiplodana, ambos o de maior e menor dose (LPS-5mg e LPS-15mg) tiveram o nível de TBARs semelhante ao do grupo LPS-SAL, o que indica que essas doses não foram eficazes em diminuir ou anular a peroxidação lipídica no cérebro dos animais. Por outro lado, o grupo LPS-10mg atingiu níveis de TBARs similares ao grupo controle SAL-SAL, sugerindo que esta dose foi eficaz em diminuir a peroxidação lipídica causada pelo modelo de neuroinflamação.

Outro dado correlacionando o modelo de neuroinflamação com o dano oxidativo foi a formação de nitrato/nitrito (produtos da reação do NO com o oxigênio) no córtex cerebral dos animais. Foi possível observar que os níveis de nitrato/nitrito do grupo LPS-SAL foram diferentes dos grupos saudáveis ( $P < 0,0001$ ), CT e SAL-SAL. Altos níveis deste radical livre e alterações em outros marcadores de estresse oxidativo como enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase em amostras de tecido cerebral de ratos submetidos ao modelo de neuroinflamação já foram descritos na literatura (ABARESHI et al, 2016).

Os valores dos grupos LPS-5mg e LPS-15mg foram similares aos do grupo neuroinflamado sem tratamento, LPS-SAL. Este resultado sugere que ambas as doses, mais baixo e mais alta, não são eficazes de amenizar o quadro de estresse oxidativo instalado pelo modelo. Já o grupo com dose intermediária, LPS-10mg, obteve níveis de nitrato/nitrito semelhante aos dos grupos controle, CT e SAL-SAL. A partir destes resultados é possível afirmar que esta dose foi eficaz em diminuir a produção dos radicais nitrato/nitrito no cérebro de animais neuroinflamados.

A neuroinflamação presente no cérebro de paciente com a DA induz ao quadro de estresse oxidativo, o qual está intimamente ligado ao processo neurodegenerativo da doença (LOPATEGUI, BATISTA, PENTON ROL, 2014). O mesmo acontece nos animais submetidos à injeção intrahipocampal de LPS. Ao administrar o LPS no hipocampo, micróglia são ativadas e conseqüentemente reagirão ao dano produzindo mediadores inflamatórios (NAVA et al, 2016; LESZEK et al, 2016; WANGE et al, 2013). A hiperatividade das células da glia, observada com frequência em modelos experimentais neurodegenerativos, pode gerar a liberação de citocinas, radicais livres, EROs, fatores complemento e óxido nítrico (GLASS et al, 2010; GORDON, et al, 2016; GRIFFIN et al, 1998). EROs são altamente reativos e atacam várias classes de biomoléculas, como DNA, proteínas e lipídios. Quando ocorre a peroxidação dos lipídios, como é o caso dos ácidos graxos poliinsaturados, esta reação é chamada de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica por sua vez gerará mais radicais livres, os quais contribuirão para disfunção neuronal e morte celular, criando então um ciclo vicioso. Todo esse processo enfim, causa um quadro de estresse oxidativo (TSIKAS, 2016).

A diminuição dos níveis de nitrato/nitrito e TBARs ocasionado pela dose de 10 mg/kg de lasiodiplodana indica que este composto pode atuar por uma via antioxidante, diminuindo os níveis de radicais livres e de peroxidação lipídica gerados pelo modelo de neuroinflamação utilizado e por consequência, amenizando o quadro de estresse oxidativo instalado.

Malfatti et al (2017) relatou que a dose de 0,01 $\mu$ g/ $\mu$ L de lasiodiplodana foi capaz de reduzir significativamente (308%) os níveis de TBARs no cérebro de ratos submetidos a um modelo de convulsão. Resultados estes sugerem que a lasiodiplodana foi capaz de proteger o cérebro dos animais dos efeitos deletérios do modelo através de uma via antioxidante, possivelmente interferindo em uma cascata de eventos neuroquímicos que provocam a morte celular, como o ataque dos radicais livres as membranas biológicas.

O efeito antioxidante da lasiodiplodana já foi testado também *in vitro*, por Kagimura e colaboradores (2015), que comprovaram a capacidade deste composto em sequestrar radicais cátion ABTS e DPPH. O achado deste trabalho com relação a atividade antioxidante da lasiodiplodana vai de acordo com a premissa de Zhang et al (2013), que sugere que o peso molecular influencia diretamente nas características físico-químicas e propriedades biológicas das biomoléculas. Xu & Du (2014) afirmam que  $\beta$ -glucanas com alto peso molecular exibem maior atividade antioxidante quando comparadas com glucanas de menor peso. Malfatti et al (2017) relatou que o peso molecular estimado da lasiodiplodana é de  $>1,4 \times 10^6$  Da, e que o mesmo pode por sua vez influenciar positivamente o potencial antioxidante desta  $\beta$ -glucana.

Sugere-se também que esta  $\beta$ -glucana possa atuar diretamente no início do processo, como um anti-inflamatório, evitando que os radicais livres sejam gerados exacerbadamente pelo processo neuroinflamatório típico do modelo utilizado. Kagimura et al (2015) sugere que entre as principais aplicações das D-glucanas está a aplicação farmacêutica, em especial como um agente terapêutico com atividade anti-inflamatória. Diferentes concentrações dos três EPS produzidos pelo fungo *L. theobromae* MMBJ foram testadas quanto a sua capacidade de produzir citocinas pro-inflamatórias (TNF- $\alpha$ ) em cultura celular. Os resultados mostraram que mesmo a menor dose, 25  $\mu$ g/ml, foi capaz de produzir maiores níveis de TNF- $\alpha$  comparado com o controle (OLIVEIRA, et al, 2015). Outros estudos corroboraram com este achado ao constatarem que outras (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucanas foram capazes de aumentar a secreção de TNF- $\alpha$  em macrófagos, tanto em experimentos utilizando cultura de células quanto *in vivo* (SMIDERLE et al, 2013). O mesmo autor ainda ressalta que a produção de certas citocinas, e a sua quantidade, dependem de como o polissacarídeo é administrado, portanto, novos estudos devem ser realizados para elucidar este mecanismo de ação *in vivo*.

Com os resultados obtidos através da tarefa de reconhecimento de objetos, pode-se observar que o protocolo foi eficaz em avaliar a memória não associativa dos animais, uma vez que houve diferença significativa ( $P < 0,001$ ) entre os grupos CT, SAL-SAL, SAL-15mg

quando comparados com o grupo LPS-SAL. O mesmo ocorreu em outros experimentos nos quais este modelo foi testado quanto ao déficit de memória na mesma tarefa (HENNIGAN, TROTTER, KELLY, 2007).

Os grupos tratados, LPS-5mg e LPS-15mg, demonstraram ser significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ) dos grupos controle CT, SAL-SAL e SAL-15mg, resultados estes sugerem que ambas as doses não foram eficazes em proteger os animais neuroinflamados do déficit de memória não associativa. Houve uma tendência com relação ao grupo LPS-10mg, o qual obteve valores mais próximos dos grupos controle (SAL-SAL, SAL-15mg e CT) do que do grupo LPS-SAL, porém, sem diferença significativa.

O comprometimento da memória vem sendo correlacionado com o aumento de radicais livres e conseqüentemente ao dano oxidativo em lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e a vulnerabilidade de várias atividades do sistema neurotransmissor ao estresse oxidativo (BUTTERFIELD et al, 2006). O declínio das funções colinérgicas são parcialmente responsáveis pelo déficit de memória durante a senescência e em casos de doenças neurodegenerativas (como é o caso da doença de Alzheimer). Um dos principais marcadores de função sináptica é a enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual encontra-se em baixas quantidades em várias regiões do cérebro de pessoas idosas (GOVONI et al, 2010). Sabe-se que a atividade da AChE é prejudicada pela presença de radicais livres e pelo quadro de estresse oxidativo (MOLOCHKINA et al, 2005). Estas informações nos sugere que o uso de suplementos e produtos naturais com poder antioxidante pode ser benéfico para prevenir o cérebro de disfunções e evitar o declínio de memória (PAPANDREOU et al, 2011). Deste modo, podemos correlacionar o efeito antioxidante da dose de 10 mg/kg de lasiodiplodana com a possível capacidade da mesma em amenizar o déficit de memória não associativa testado pela tarefa de reconhecimento de objetos.

A memória associativa foi avaliada através de dois aparatos, o labirinto aquático de Morris e o labirinto octogonal. Os resultados do labirinto aquático demonstraram que os animais dos grupos controle: CT, SAL-SAL e SAL-15mg, foram capazes de recordar onde estava a plataforma no dia do teste, quando a mesma fora retirada. Isso foi comprovado nos parâmetros de tempo de latência e número de cruzamentos, pois no primeiro estes grupos tiveram um tempo significativamente ( $P < 0,04$ ) menor do que o grupo LPS-SAL e no segundo demonstraram número significativamente maior ( $P < 0,04$ ) do que o grupo LPS-SAL, ou seja, demoraram menos tempo para encontrar o local da plataforma e passaram mais vezes pelo ponto exato onde a mesma se encontrava, procurando-a. Este resultado demonstra que o protocolo escolhido para a realização desta tarefa foi eficaz para avaliar a

memória dos animais, uma vez que os animais destes grupos são considerados controles saudáveis (ratos sem doença). O mesmo ocorreu quando outros pesquisadores utilizaram a substância LPS como um modelo de neuroinflamação e posteriormente testaram a memória espacial dos animais no labirinto aquático (ARAI et al, 2001).

Em outro parâmetro, permanência, entre os grupos controle citados acima, somente o grupo CT foi diferente ( $P < 0,04$ ) do grupo LPS-SAL. Isso pode ser explicado pelo fato de que, uma vez que o animal passa várias vezes pelo local onde estava previamente a plataforma e não a encontra, o mesmo decide procura-la em outros quadrantes, ou seja, esse parâmetro depende da estratégia utilizada pelo animal para encontrar a plataforma de escape (VALERO et al, 2014).

Com relação aos grupos tratados com a  $\beta$ -glucana, o grupo que recebeu a maior dose deste composto, LPS-15mg, demonstrou tempo de latência significativamente ( $P < 0,03$ ) maior quando comparado aos grupos CT e SAL-SAL; tempo menor ( $P < 0,04$ ) de permanência quando comparado ao grupo CT e número menor ( $P < 0,03$ ) de cruzamentos com relação ao grupo SAL-SAL e SAL-15mg. Estes resultados sugerem que o tratamento na dose de 15mg/kg de  $\beta$ -glucana não foi capaz de retardar o processo amnésico causado pelo LPS, por isso o tratamento com essa dose demonstra-se ineficiente. No que se diz respeito as demais doses, 05 e 10mg/kg, não houve diferença significativa entre os grupos, porém, pode-se observar uma tendência no parâmetro cruzamento do grupo LPS-05mg em se aproximar dos valores obtidos pelos grupos CT, SAL-SAL e SAL-15mg.

Outro estudo realizado pelo grupo analisou os efeitos da dose (intracerebroventricular) de 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de lasiodiplodana frente a um modelo animal de alteração comportamental, D-penicilamina. Os resultados demonstraram que a lasiodiplodana foi capaz de reverter por completo os sinais comportamentais típicos do modelo, episódios convulsivos (MALFATTI, et al, 2017). Observando os gráficos obtidos através dos resultados da avaliação de memória no labirinto aquático de Morris no presente estudo, podemos observar que quanto menor foi a dose de lasiodiplodana administrada nos animais, maior é a tendência dos mesmos em se equiparar com os grupos controle (CT, SAL-SAL e SAL-15mg). Uma vez que uma dose baixa (0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) fora utilizada intracerebroventricularmente e mostrou interferir positivamente no comportamento dos animais, é possível que a administração de doses menores que 0,5 mg/kg administradas via gavagem possam alterar também o desempenho dos animais no labirinto aquático de Morris. Nunca em outro estudo o efeito da lasiodiplodana frente a déficits de memória foi testado,

portanto, novos experimentos devem ser realizados para comprovar esta relação dose-resposta.

Nos dados demonstrados no presente experimento, os animais do grupo LPS-SAL não apresentaram déficit de memória na tarefa no labirinto octogonal. Estes animais foram capazes de recordar entre uma sessão e outra (em dias diferentes) onde as recompensas estavam dispostas, bem como, recordar quais braços tinham sido visitados durante uma mesma corrida. Nenhum parâmetro avaliado nesta tarefa foi significativamente diferente entre o grupo não saudável (LPS-SAL) e o grupo saudável (CT). O que aconteceu é que todos os animais tiveram resultados satisfatórios com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a primeira sessão de teste e a última, portanto, todos aprenderam e/ou memorizaram as informações desta tarefa. Outro estudo também demonstrou uma situação semelhante ao do presente trabalho. Nesse, os animais com 70-90% de perda neuronal na região CA1 do cérebro apresentaram prejuízo de memória ao realizar a tarefa no labirinto aquático de Morris. Já quando o mesmo grupo de animais foi testado no labirinto octogonal (utilizando o mesmo protocolo do presente estudo, proposto por Jarrard), apresentaram um desempenho satisfatório nesta tarefa, com diminuição significativa no número de erros entre a primeira e a quinta sessão de treino (NUNN et al, 1991).

Diferentes testes comportamentais usando labirintos são utilizados para avaliar memória e aprendizado de animais usando dicas visoespaciais no ambiente, entretanto, estes podem ser diferentes em muitos aspectos, como: a) tipo e material do aparato; b) disponibilidade de dicas visoespaciais, associativas e sensoriais; c) requisitos necessários para realização do teste que variam desde a exploração espontânea, a sequencias complexas de escolhas; e d) motivação, que pode envolver escape, descobrimento de novos objetos ou recompensas em locais específicos (BUSHNELL & DRISCOLL, 2015). Por conta de todas essas variáveis seria incoerente afirmar que os testes de memória (seja no Labirinto Aquático de Morris, Labirinto Octogonal, ou outros) fazem com que o animal utilize os mesmos processos cognitivos durante a tarefa. É questionável o quanto as informações não-espaciais e espaciais (visoespaciais por exemplo) podem ser comparadas entre diferentes tarefas espaciais (AGGLETON et al, 1991). Ambos os labirintos, octogonal e aquático de Morris, são testes de memória associativa e proporcionam tarefas espaciais que dão a oportunidade aos animais de construírem mapas cognitivos através de dicas visoespaciais (BUSHNELL & DRISCOLL, 2015). Porém, os ratos podem utilizar outras habilidades, que não as visuais, para construir estes mapas, como as modalidades táteis e olfatórias por exemplo. Além de variarem em diversos aspectos já citados, labirintos diferentes podem explorar também uma

variedade de processos cognitivos diferentes, incluindo o aprendizado associativo e procedural (HODGES, 1996).

## **7. CONCLUSÃO**

Conclui-se que:

- Nenhuma dose de lasiodiplodana interferiu na atividade locomotora, exploratória e emocional dos ratos do presente estudo;
- A dose de 15 mg/kg de lasiodiplodana não foi eficaz como tratamento para neuroinflamação e possivelmente inicie um processo tóxico no cérebro dos animais;
- As doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg de lasiodiplodana podem ser capazes de reverter o quadro amnésico subsequente ao processo neuroinflamatório, no se que diz respeito a memória associativa e não associativa, respectivamente;
- A dose de 10 mg/kg mostrou ter efeito antioxidante no cérebro de animais neuroinflamados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARESHI, A.; HOSSEINI, M.; BEHESHTI, F.; et al. The effects of captopril on lipopolysaccharide induced learning and memory impairments and the brain cytokine levels and oxidative damage in rats. **Life Sciences**. v.167, p.46–56, 2016.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABBAS, N.; BEDNAR, I.; MIX, E.; et al. Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. **J Neuroimmunol**. v.126, p.50–7, 2002.

AGDEPPA, E.D.; KEPE, V.; PETRI, A.; et al. In vitro detection of (S)-naproxen and ibuprofen binding to plaques in the Alzheimer's brain using the positron emission tomography molecular imaging probe 2-(1-[6-[(2- (18)F]fluoroethyl)( methyl)amino]-2-naphthyl]ethylidene)malono nitrile. **Neuroscience**, v.117, p.723–30, 2003.

AGGLETON, J.P.; KEITH, A.B.; SAHGAL, A. Fimbria fornix and anterior thalamic, but not mamillary, lesions disrupt delayed nonmatching-to-position memory in rats, **Behav. Brain Res**. v.44, p.151-161, 1991.

AHMED, O. G.; THABET, H. Z.; MOHAMED, A. A., 2014. Inflammation versus oxidative stress in pathophysiology of Alzheimer's disease in rat model. **Ibnosina J. Med. BS**. v.6, p.130-144, 2014.

AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**. v.21, p.383–42, 2000.

ALI, S. H. The world of  $\beta$ -glucans – a review of biological roles, applications and potential areas of research. 2009. 45p. Dissertação (Master of Science – **Medical Biology**) - Institute of Medical Biology, Faculty of Medicine, University of Tromsø, Norway. 2009.

ALZHEIMER, A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. **Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie**, v. 4, p. 356-385, 1911.

ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin**, v. 64, p.146-148, 1907.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2014 **Alzheimer's Disease Facts and Figures, Alzheimer's & Dementia**. v 10, n. 2. 2014.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2015 **Alzheimer's Disease Facts and Figures, Alzheimer's & Dementia**. v.11, n.3. 2015.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2016 **Alzheimer's Disease Facts and Figures, Alzheimer's & Dementia**. v. 12, n.4. 2016.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. **Kyoto Declaration: Minimum actions required for the care of people with dementia**. 20th International Conference of

Alzheimer's disease international, 2004. Disponível em: <<http://www.alz.co.uk/adi/pdf/kyotodeclaration.pdf>>. Acesso em: 26 ago., 2015.

ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL. **Policy Brief for Heads of Government: The Global Impact of Dementia 2013-2050**. London, 2013. p.8.

ANTHONY, J.C.; BREITNER, J.C.; ZANDI, P.P.; et al. Reduced prevalence of AD in users of NSAIDs and H2 receptor antagonists: the Cache County study. **Neurology**, v.11, p. 2066-71, 2000.

ARAI, K.; MATSUKI, N.; IKEGAYA, Y.; et al. Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice. **Jpn J Pharmacol**. v.87, p.195–201, 2001.

ARCHERS, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB J**. v.7, p.349-60, 1993.

ASHWELL, K. Direct and indirect effects on the lateral geniculate nucleus neurons of prenatal exposure to methylazoxymethanol acetate. **Brain Research**. v.432, p.199–214, 1987.

AUSS-WEGRZYNIAK, B.; DOBRZANSKI, P.; STOEHR, J.D.; et al. Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. **Brain Res**. v.780, p.294–303, 1998.

B.D.W.G Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin. Pharmacol. Ther**. 69, 89–95, 2001.

BAGGIO, C. H. **Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e antiinflamatória da (1→3),(1→6) β-glucana isolada do Pleurotus pulmonarius**. 2010. 120p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BARBOSA, A. M.; DA CUNHA, P.D.T.; PIGATTO, M.M; et al. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.25, p.29-42, 2004.

BARNES, P.M.; BLOOM, B.; NAHIN, R.L. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007. **Natl. Health. Stat. Report**. v.12, p.1–23, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, São Paulo, v.29, p.113-123, 2006.

BARROS, D.M.; MELLO, E.; SOUZA, T.; et al. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D-1, beta noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. **Behav Brain Sci**. v. 124, p.1-7, 2001.

BEACH, T.; MONSELL, S.; PHILLIPS, L.; et al. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005–2010. **J. Neuropathol. Exp. Neurol**. v.71, p.266–273, 2012.

BEHL, C.; DAVIS, J.B.; LESLEY, R.; et al. Hydrogen peroxide mediates amyloid b protein toxicity. **Cell**. v.77, p. 817-27, 1994.

BENEDETTI, A.; COMPORTI, M.; FULCERI, R.; et al. Cytotoxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. Identification of 4,5-dihydroxydecenal. **Biochim. Biophys.** v.792, p.172-181, 1984.

BERDAL, M.; APPELBOM, H. I.; EIKREM, J. H.; et al. Aminated beta-1,3-D-glucan improves wound healing in diabetic db/db mice. **Wound Repair and Regeneration**, v.15, p.825-832, 2007.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial nonmatching-to-sample learning task to study "recognition memory". **Journal home: Nature Protocols**, v.1, p.1306–1311, 2006.

BEZZI, P.; DOMERCQ, M.; BRAMBILLA, L.; et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. **Nat Neurosci**. v.4 p.702–10, 2001.

BLASKO, I.; APOCHAL, A.; BOECK, G.; et al. Ibuprofen decreases cytokine-induced amyloid beta production in neuronal cells. **Neurobiol Dis**. v.8, p.1094–101, 2001.

BLENNOW, K.; HAMPEL, H.; WEINER, M.; et al. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers for Alzheimer's disease. **Nat. Rev. Neurol**. v.6, p.131–144, 2010.

BOJE, K.M.; ARORA, P.K. Microglial-produced nitric-oxide and reactive nitrogen-oxides mediate neuronal cell-death. **Brain Res**. v.587, p.250–6, 1992.

BONINI, J. S. ; DA SILVA, W. C. ; BEVILAQUA, L. R. M.; et al. . On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**, v. 147, p. 37-45, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde. **O que é a doença de Alzheimer?**. Brasília, DF, 2002. Serie A - Normas e Manuais Técnicos, n. 132, p. 28.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, p.148, 2006a.

BRASIL. Portaria nº971 de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2006b.

BREITNER, J.C. Inflammatory processes and antiinflammatory drugs in Alzheimer's disease: a current appraisal. **Neurobiol Aging**. v.17, p.789-94, 1996.

BREITNER, J.C.; WELSH, K.A.; HELMS, M.J.; et al. Delayed onset of Alzheimer's disease with nonsteroidal anti-inflammatory and histamine H2 blocking drugs. **Neurobiol Aging**. v.16, p.523-30, 1995.

BROMLEY-BRITS, K.; DENG, Y.; SONG, W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. **J Vis Exp.** v. 53, p.2920, 2011.

BROWN, G.C.; BAL-PRICE, A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. **Mol Neurobiol.** v.27, p. 325–55, 2003.

BUSHNELL, P.J. Behavioral approaches to the assessment of attention in animals. **Psychopharmacology.** v.138, p.231–259, 1998.

BUSHNELL, P.J.; DRISCOLL, L.L. Cognitive Function. Reference Module in **Biomedical Research.** Elsevier. 2015

BUTTERFIELD, D.A.; ABDUL, H.M.; NEWMAN, S.; et al. Redox proteomics in some age-related neurodegenerative disorders or models thereof. **NeuroRx.** v.3, p.344–57, 2006.

BUTTERFIELD, D.A.; DRAKE, J.; POCERNICH, C.; et al. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. **TRENDS in Molecular Medicine.** v.7, p. 548-54 , 2001.

CASTELLO, M.A.; SORIANO, S. Rational heterodoxy: Cholesterol reformation of the amyloid doctrine. **Ageing Res. Ver.** v.12, p. 282–288, 2013.

CAYTON, H.; WARNER, J.; GRAHAM, N. **Tudo sobre doença de Alzheimer: respostas as suas dúvidas.** São Paulo: Andrei, 2000.

CHO, H.; CHOI, J.Y.; LEE, S.H., et al. Excessive tau accumulation in the parieto-occipital cortex characterizes early-onset Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging.** v.53, p. 103-111, 2017.

CHOA, E. J.; OHA, J. Y.; CHANGB, H. Y.; et al. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. **Journal of Biotechnology.** v. 127 , p. 129–140, 2006.

CLARK, C.; XIE, S.; CHITTAMS, J.; et al. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? **Arch. Neurol.** v.60, p.1696–1702, 2003.

CUNHA, M. A. A.; TÚRMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v.39, p.1179-1188, 2012.

CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quim. Nova,** v.32, p.649-660, 2009.

DAVIS, J. M.; MURPHY, E. A.; BROWN, A. S.; et al. Effects of oat  $\beta$ -glucan on innate immunity and infection after exercise stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise,** v.36, p.1321–1327, 2004.

DEL VALLE, L. G. "Oxidative stress in aging: theoretical outcomes and clinical evidences in humans". **Biomedicine & Aging Pathology**. v.1, p.1-7, 2011.

DENG, X.H.; AI, W.M.; LEI, D.L.; et al. Lipopolysaccharide induces paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) expression, synaptic alteration, and learning-memory deficit in rats. **Neuroscience**. v.209, p.161-170, 2012.

DIJKGRAAF, G. J. P.; HUIJUAN, L.; BUSSEY, H. Cell-wall  $\beta$ -glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. In: VANDAMME E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. Biopolymers: polysaccharides II – polysaccharides from eukaryotes. **Weinheim: Wiley-VCH Verlag Gmbh**. v. 6, p. 179-213, 2002.

DORE, C. M. P. **Estudo de glucanas extraídas dos fungos *Geastrum factum* e *Polyporus dermoporus***. 2006. 93p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade do Rio Grande do Norte, 2006.

DU, B.; XU, B. J. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) of  $\beta$ -glucans from different sources with various molecular weight. **Bioactive Carbohydrate and Dietary Fibre**. v.3,p.11-16.2014.

DU, B.; XU, B. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) of  $\beta$ -glucans from different sources with various molecular weight. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. v.3, p.11–16, 2014.

DUARTE, M.; MORESCO, R.N.; DE BEM, A.F. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. **RBAC**. v.40, p.101-6, 2008.

EHRET, M.J.; CHAMBERLIN, K.W. Current Practices in the Treatment of Alzheimer Disease: Where is the Evidence After the Phase III Trials?. **Clin. Ther**. v.37, p.1604-16, 2015.

ERIKSEN, J.L.; SAGI, S.A.; SMITH, T.E.; et al. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gammasecretase and lower Abeta 42 in vivo. **J Clin Invest**. v.112, p.440–9, 2003.

ESTERBAUER, H.; CHEESMAN, K.H.; DIANZANI, M.U.; et al. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe2p in rat liver microsomes. **Biochem. J**. v.208, p.129–140. 1982.

FAGAN, A. M.; PERRIN, R.J. Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. **Biomarkers Med**. v.6, p. 455–476, 2012.

FERRI, C.P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **Lancet**, v.366, p. 2112-2117, 2005.

FETLER, L.; AMIGORENA, S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. **Science**. 2005.

FISCHER, O. Miliare Nekrosen mit drusigen Wucherungen der Neurofibrillen, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz. **Monatsschr Psychiat Neurol.** v.22, p.361–72, 1907.

FREDERIKSE, P.H.; GARLAND, D.; ZIGLER, J.S.; et al. Oxidative stress increases production of b-amyloid precursor protein and bamyloid (Ab) in mammalian lenses, and Ab has toxic effects on lens epithelial cells. **J Biol Chem.** v.271, p. 10169-74, 1996.

FU, H.; RODRIGUEZ, G.A., HERMAN, M., et al. Tau Pathology Induces Excitatory Neuron Loss, Grid Cell Dysfunction, and Spatial Memory Deficits Reminiscent of Early Alzheimer's Disease. **Neuron.** v.93, p. 533-541, 2017.

FUJIHARA, S. **Alterações oxidativas em portadores da doença de Alzheimer: correlação com os estágios da doença e o quadro cognitivo dos pacientes.** 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular.) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, 2012.

G8 UK. **G8 Dementia Summit Declaration.** 2013. Disponível em: <[https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/265869/2901668\\_G8\\_DementiaSummitDeclaration\\_acc.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/265869/2901668_G8_DementiaSummitDeclaration_acc.pdf)>. Acesso em: 26 ago.2015.

GAUTHIER, S.; REISBERG, B.; ZAUDIG, M.; et al. Mild cognitive impairment. **Lancet.** v.367, p.1262-1270, 2006.

GIESE, E.C.; GASCON, J.; ANZELMO, G.; et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other  $\beta$ -D-glucans. **International Journal of Biological Macromolecules.** v.72, p.125-30, 2014.

GLASS, C.K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell.** v.140, p.918-934, 2010.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial Polysaccharides and Polyesters. **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology.** 2. Ed. New York : Cambridge University Press, 2007.

GORDON, R.; SINGH, N.; LAWANA, V.; et al. Protein kinase Cdelta upregulation in microglia drives neuroinflammatory responses and dopaminergic neurodegeneration in experimental models of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.** v. 93, p.96-114, 2016.

GOVONI, S.; AMADIO, M.; BATTAINI, F.; et al. Senescence of the brain: focus on cognitive kinases. **Curr Pharm Des.** v.16, p.660–71, 2010.

GRIFFIN, W.S.; SHENG, J.G.; ROYSTON, M.C.; et al. Glial–neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. **Brain Pathol.** v.8, p. 65-72, 1998.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol.** v.11,p.298-300,1956.

HEBERT, L.E.; WEUVE, J.; SCHERR, P.A.; et al. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 Census. **Neurology**. v.80, p.1778-83, 2013.

HEKIMI, J. L.; LAPOINTE, J.; YANG, W. "Taking a 'good' look at free radicals in the aging process". **Trends in Cell Biology**, v.21, p.569, 2011.

HENEKA, M.T. Inflammation in Alzheimer's disease. **Clinical Neuroscience Research**. v.6, p.247-260, 2006.

HENEKA, M.T.; CARSON, M.J.; EL KHOURY, J.; et al Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol**. v.4, p.388-405, 2015.

HENEKA, M.T.; FEINSTEIN, D.L. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. **J Neuroimmunol**. v.114, p. 8–18, 2001.

HENEKA, M.T.; LOSCHMANN, P.A.; GLEICHMANN, M.; et al. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxidemediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. **J Neurochem**. v.71, p.88–94, 1998.

HENEKA, M.T.; SASTRE, M.; DUMITRESCU-OZIMEK, L.; et al. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. **J Neuroinflamm**. v.2, p.22, 2005.

HENEKA, M.T.; WIESINGER, H.; DUMITRESCU-OZIMEK, .L; et al. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**. v.60, p.906–16, 2001.

HENNIGAN, A.; TROTTER, C.; KELLY, A.M. Lipopolysaccharide impairs long-term potentiation and recognition memory and increases p75NTR expression in the rat dentate gyrus. **Brain Res**. v.1130, p.158–166, 2007.

HENSLEY, K.; CARNEY, J.M.; MATTSON, M.P.; et al. A model for b-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: Relevance to Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.91, p.3270-4, 1994.

HODGES, H. Maze procedures: the radial-maze and water maze compared. **Cognitive Brain Research**. v.3, p.167-181, 1996.

IN T'VELD, B.A.; RUITENBERG, A.; HOFMAN, A.; et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. **N Engl J Med**. v.345, p. 1515-21, 2001.

IZQUIERDO, I. A mente humana. **Multiciência**. v.3, p.1-7, 2004.

IZQUIERDO, I. Memórias. **Estud. Av**. v.3, n.6, p.89-112, 1989.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; CAMMAROTA, M. A arte de esquecer. **Estud. Av**. v.20, p.289-296, 2006.

JARRARD, L. E.; OKAICHI, H.; STEWARD, O.; et al. On the role of hippocampal connections in the performance of place and cue tasks: comparisons with damage to hippocampus, **Behavioral Neuroscience**, vol. 98, p. 946–954, 1984.

KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; et al. Biological activities of derivatized D-glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.72, p.588-98, 2014.

KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A. A. ; THEIS, T. V.; et al. Carboxymethylation of (1→6)- $\beta$ -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v.127, p. 390-399, 2015.

KALRA, J.; KHAN, A. Reducing A $\beta$  load and tau phosphorylation: Emerging perspective for treating Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**. v.764, p.571–581, 2015.

KAUFMANN, W.E.; ANDREASSON, K.I.; ISAKSON, P.C.; et al. Cyclooxygenases and the central nervous system. **Prostaglandins**. v.54, p.601-24, 1997.

KOGAN, G.; STASKO, A.; BAUEROV, A.K.; et al. Antioxidant properties of yeast (1/3)- $\beta$ -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis. **Carbohydrate Polymers**, v.61, p.18-28,2005.

KRSTIC, D.; KNUESEL, I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. v. 9, p.25-34, 2013.

KUBALA, L.; JANA, R.; KRISTINA, N.; et al. The effect of (1→3)- $\beta$ -D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydrate Res**. v. 338, p. 2835-40, 2003.

LEE, J.N.; LEE, D.Y.; JI, I.H.; et al. Purification of Soluble  $\beta$ -Glucan with Immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.65, n.4, p.837-841, 2001.

LEE, M.H.; RABE, A. Premature decline in Morris water maze performance of aging micrencephalic rats. **Neurotoxicology and Teratology**. v.14, p.383–392, 1992.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2005.

LESZEK, J.; BARRETO, G.E.; GASIOROWSKI, K.; et al. Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v.15, p.329-336, 2016.

LIM, G.P.; YANG, F.; CHU, T.; et al. Ibuprofen effects on Alzheimer pathology and open field activity in APPsw transgenic mice. **Neurobiol Aging**. v.22, p.983–91, 2001.

LIM, G.P.; YANG, F.; CHU, T.; et al. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. **J Neurosci**. v.20, p.5709–14, 2000.

LIMA, D.A. Tratamentos farmacológicos da Doença de Alzheimer. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**. v.7, p.78-87, 2008.

LLORET, A.; FUCHSBERGER, T.; GIRALDO, E.; et al. Molecular mechanisms linking amyloid  $\beta$  toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 83, p.186–191, 2015.

LOPATEGUI, C. I.; HERRERA, B. A.; PENTON R. G. The role of glial cells in Alzheimer disease: potential therapeutic implications. **Neurologia**. v. 29, p.305-309, 2014.

]

LORENS, J.; CROFTON, K.M.; TILSON, H.A.; et al. Characterization of disulfoton-induced behavioral and neurochemical effects following repeated exposure. **Fundamental and Applied Toxicology**. v.20, p.163–169, 1993.

LOY, C.T.; SCHOFIELD, P.R.; TURNER, A.M.; et al. Genetics of dementia. **Lancet**. v.383, p. 828-40, 2014.

LUCZKOWSKI, M. No screams and cries will convince us that white is white and black is black”, an ode to the defenders of amyloid cascade hypothesis of Alzheimer’s Disease. **Coordination Chemistry Reviews**. v.327-328, p.35-42, 2016.

MACCIONI, R. B.; FARÍAS, G.; MORALES, I.; et al. The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. **Archives of Medical Research**. v.41, p. 226–231, 2010.

MAITY, P.; SEN, I. K.; MAJI, P. K.; et al. Structural, immunological, and antioxidant studies of  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Entoloma lividoalbum*. **Carbohydrate Polymers**. v. 123, p. 350-358, 2015.

MALFATTI, C.R.M.; SANTOS, F.S.; WOUK, J.; et al. Intracerebroventricular administration of the (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan (lasiodiplodan) in male rats prevents D-penicillamine-induced behavioral alterations and lipoperoxidation in the cortex. **Pharmaceutical Biology**. v.55, p.1289-1294, 2017.

MCGEER, E. G.; MCGEER, P. L. Neuroinflammation in Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. **J Alzheimers Dis**, v. 19, p. 355-61, 2010.

MCGEER, P.L.; SCHULZER, M.; MCGEER, E.G.; Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer’s disease:a review of 17 epidemiologic studies. **Neurology**. v.47, p.425-32, 1996.

MCKHANN, G.; DRACHMAN, D.; FOLSTEIN, M.; et al. Clinical diagnosis of Alzheimer’s disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer’s Disease. **Neurology**. v. 34, p.939–944, 1984.

MIHAILOVIC’, M.; ARAMBAŠIĆ’, J.; USKOKOVIĆ’, A.  $\beta$ -Glucan administration to diabetic rats reestablishes redox balance and stimulates cellular prosurvival mechanisms. **Journal of Functional Foods**. v.5, p.267–278. 2013

MIRANDA-NANTES, C.C.B.O.; FONSECA, E.A.I.; ZAIA, C.T.B.V.; et al. Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats. **Mycobiology**. v.39, p.187–193, 2011.

MISONOU, H.; MORISHIMA-KAWASHIMA, M.; IHARA, Y. Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid b-protein (Ab) in human neuroblastoma cells. **Biochemistry**. v.39, p.6951–59, 2000.

MOLOCHKINA, E.M.; ZORINA, O.M.; FATKULLINA, L.D.; et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modifies membrane structure and activity of acetylcholinesterase. **Chem Biol Interact**. v.157, p.401–4, 2005.

MORRIS, J.C. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**. v.43, p. 2412-4, 1993.

NANDI, A. K.; SAMANTA, S.; MAITY, S.; et al. Antioxidant and immunostimulant  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. **Carbohydrate Polymers**, v.99, p. 774–782, 2014.

NASCIMENTO, M. S. **Avaliação das propriedades farmacológicas de polissacarídeos do fungo *Scleroderma nitidum***. 2010. 133p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade do Rio Grande do Norte, 2010.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **The dementias – Hope Through Research**. n. 13, p.2252, 2013.

NAVA, C., M.; ACERO, G.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; et al. Alphamangostin attenuates brain inflammation induced by peripheral lipopolysaccharide administration in C57BL/6J mice. **J Neuroimmunol**. v.297, p.20-27, 2016.

NELSON, P.T.; ALAFUZOFF, I.; BIGIO, E.H.; et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.71, p. 362–381, 2012.

NEURO PATHOLOGY. 2012. Acesso em: 27 de março de 2017. Disponível em: <http://www.proprofs.com/flashcards/cardshowall.php?title=neuro-pathology>.

NUNN, J.A.; LE PEILLET, E.; NETTO, C.A.; et al. CA1 cell loss produces deficits in the water maze but not in the radial maze, **Soc. Neurosci. Abstr**. v.17, p.108, 1991.

NUNOMURA, A.; PERRY, G.; ALIEV, G.; et al. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**. v.60, p.759–67, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. v.95, p.351–358, 1979.

OLIVEIRA, K.S.M.; BASTIANI, M. D.; CORDEIRO, L.M.C.; et al. (1→6)- and (1→3)(1→6)- $\beta$ -glucans from *Lasioidiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**. v.133, p. 539-546, 2015.

PAPANDREOUA, M.A.; TSACHAKI, M.; EFTHIMIOPOULOS, S.; et al. Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. **Behavioural Brain Research**. v.2019, p.197-204, 2011.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**, 2. ed. San Diego: Academic, 2001.

PEDERSEN, J. T.; SIGURDSSON, E. M. Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. **Cell Press**. v. 21, p. 394–402, 2015.

PELIZON, A. C.; KANENO, R.; SOARES, A. M. V. C.; et al. Immunomodulatory activities associated with  $\beta$ -glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. **Physiological Research**. v.54, p.557–564, 2005.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience**. v.14, p.149-67, 1985.

PERRY, G.; CASH, A.D.; SMITH, M.A. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. **J Biomed Biotechnol**. v.2, p.120–123, 2002.

PETERSEN, R.C.; SMITH, G.E.; WARING, S.C.; et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. **Arch. Neurol**. v.56, p.303-308, 1999.

PETRONILHO, E. DA C.; PINTO, A.C.; VILLAR, J. D. F. Cetilcolinesterase: alzheimer e guerra química. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 28, p.03-14, 2011.

PIRCHL, M.; KEMMLER, G.; HUMPE C. Female Sprague Dawley Rats Show Impaired Spatial Memory in the 8-Arm Radial Maze under Dim Blue and Red Light. **International Journal of Zoology**, v.2010, p.8, 2010.

REVETT, T.J.; BAKER, G.B.; JHAMANDAS, J. et al. Glutamate system, amyloid  $\beta$  peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. **J Psychiatry Neurosci**. v.38, p.6-23, 2012.

RICH, J.B.; RASMUSSEN, D.X.; FOLSTEIN, M.F.; et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. **Neurology**. v.45, p.51–5, 1995.

ROGERS, J.; KIRBY, L.C.; HEMPELMAN, S.R.; et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. **Neurology**. v.43, p. 1609-11, 1993.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v.16, p.311-318, 2011.

SADOVSKAYA, I.; SOUISSI, A.; SOUISSI, S.; et al. Chemical structure and biological activity of a highly branched (1 → 3,1 → 6)-β-D-glucan from *Isochrysis galban*. **Carbohydr. Polym.** v.111, p.139–148, 2014.

SALUK, J.; BIJAK, M.; PONCZEK, M.B.; et al. (1→3)-D-Glucan reduces the damages caused by reactive oxygen species induced in human platelets by lipopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers.** v.97, p.716–724, 2013.

SALUK-JUSZCZAK, J.; KRÓLEWSKA, K.; WACHOWICZ, B. (1→3)-β- d-Glucan inhibits a dual mechanism of peroxynitrite stroke. **International Journal of Biological Macromolecules.** v.48, p.488–494, 2011.

SASTRE, M.; DEWACHTER, I.; LANDRETH, G.E.; et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. **J Neurosci.** v.23, p.9796–804, 2003.

SERENIKI, A.; VITAL, M.A.B.F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e Farmacológicos. **Rev. Psiquiatr.** v.30, n.1, 2008.

SHAHANI, N.; BRANDT, R. Functions and malfunctions of the tau proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences.** v.59, p.1668-1680, 2002.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.16, p.455-462, 2006.

SILVA, W.C.N; KÖHLER, C.C.; RADISKE, A., et al. D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> dopamine receptors modulate spatial memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory.** v.97, p.271–275, 2012.

SILVEIRA, M.L.L.; SMIDERLE, F.R.; MORAES, C.P.; et al. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear β-D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydr. Polym.** v.113 p. 588-96, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Rev. bras. farmacogn [online].** v.12, p.35-40, 2002.

SMIDERLE, F.R.; ALQUINI, G.; TADRA-SFEIR, M.Z.; et al. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1 → 6)-β-D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydr. Polym.** v.94, p.91–99, 2013.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **C R Biol.** v.327, p.649-62, 2004.

SOUZA, P. F. **Estudo dos possíveis efeitos neuroprotetores de substâncias antioxidantes em modelo animal de neuroinflamação aguda.** 01/09/2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava/PR, 2016.

STELUTI, R. M.; GIESE E.C.; PIGGATO M. M.; et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of basic Microbiology**. v.44, p. 480-486, 2004.

STEWART, W.F.; KAWAS, C.; CORRADA, M.; et al. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. **Neurology**. v.48, p.626-32, 1997.

SUCHECKA, D.; HARASYM, J.P.; WILCZAK, J.; et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects of high beta-glucan concentration purified aqueous extract from oat in experimental model of LPS-induced chronic enteritis. **Journal of Functional Foods**. v, 14, p.244-254, 2015.

SUNDERLAND, T.; LINKER, G.; MIRZA, N.; et al. Decreased b-amyloid1–42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. **JAMA**, v.289, p.2094–2103, 2003.

SZEKELY C.A.; THORNE, J.E.; ZANDI, P.P.; et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the prevention of Alzheimer's disease: a systematic review. **Neuroepidemiology**. v. 23, p. 159-69, 2004.

TAKAHASHI, H.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; et al. Association of immunological disorders in lethal side effect of NSAIDs on  $\beta$ -glucan-administered mice. **Immun. Med. Microb.**, v. 31, p. 1-14, 2001.

TAN, J.; TOWN, T.; PARIS, D.; et al. Microglial activation resulting from CD40–CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. **Science**. v.286, p.2352–5, 1999.

THOMAS, T.; NADACKAL, T.G.; THOMAS, K. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit amyloid-beta aggregation. **Neuroreport**.. v.12, p.3263–7, 2001.

TOKLU, H. Z.; SENER, G.; JAHOVIC, N.; et al. Betaglucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. **International Immunopharmacology**. v.6, p.156-169, 2006.

TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBFLEISCH, J.; et al. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. **Free Radic Biol Med**. v.30, p.393–402, 2001.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical Biochemistry**. v.2697, p.30357-8, 2016

TUPPO, E.E.; ARIAS, H.R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol**. v.37, p.289-305, 2005.

TÚRMINA, J. A.; CARRARO, E.; CUNHA, M.A.A.; et al. Toxicological Assessment of  $\beta$ -(1 6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules (Basel. Online)**. v. 17, p. 14298-14309, 2012.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA FDA Approved Drugs by Medical Condition. Disponível em: <<https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/medical-conditions/>>. Acesso em: 29 março, 2017.

USKOKOVIC´, A.; MIHAJLOVIC´, M.; DINIC´, S. Administration of a  $\beta$ -glucan-enriched extract activates beneficial hepatic antioxidant and antiinflammatory mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods**. v.5, p.1966–1974, 2013.

VALERO, J.; MASTRELLA, G.; NEIVA, I.; et al. Long-term effects of an acute and systemic administration of LPS on adult neurogenesis and spatial memory. **Front Neurosci**. v.8, p.83, 2014.

VASCONCELOS, A.F.; MONTEIRO, N.K.; DEKKER, R.F.; et al. Three exopolysaccharides of the b-(1→6)-D-glucan type and a b-(1→3;1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**. v.343, p.2481–2485, 2008.

VILLEGAS, S. Enfermedad de Alzheimer: nuevas estrategias terapêuticas. **Medicina Clínica**. v. 145, p. 76–83, 2015.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**. v. 13, p. 42-47, 1956.

WANG, J.; WU, W.Y.; HUANG, H.; et al. Biochanin A Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Damage of Dopaminergic Neurons Both In Vivo and In Vitro via Inhibition of Microglial Activation. **Neurotox Res**. v.30, p. 486-98, 2016.

WEGGEN, S.; ERIKSEN, J.L.; DAS, P.; et al. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. **Nature**. v.414, p.212–6, 2001.

WENG, B.B.C.; LIN, Y.C.; HU, C.W.; et al. Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran ( $\beta$ -glucan) produced by *Botryosphaeria rhodina* RCYU 30101. **FoodChem. Toxicol**. v.49, p.910–916, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DEMENTIA: a public health priority**. 2012. Disponível em: <[http://www.who.int/mental\\_health/publications/dementia\\_report\\_2012/en/](http://www.who.int/mental_health/publications/dementia_report_2012/en/)>. Acesso em: 26 ago., 2015.

WORLD POPULATION AGEING. New York, NY, United Nations, 2009 Disponível em: <[http://www.un.org/esa/population/publications/WPA2009/WPA2009\\_WorkingPaper.pdf](http://www.un.org/esa/population/publications/WPA2009/WPA2009_WorkingPaper.pdf)>. Acesso em: 26 ago., 2015.

WYSS-CORAY, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nat Med**. v.12, p.1005-1015, 2006.

XU, J.Q.; MURPHY, S.L.; KOCHANNEK, K.D.; et al. Deaths: Final data for 2013. **National vital statistics reports**. v.64, p.1-119, 2016.

YAN, S.D.; YAN, S.F.; CHEN, X.; et al. Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidative stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid  $\beta$ -peptide. **Nature Med.** v.1, p.693-699, 1995.

YUAN, C.; HUANG, X.; CHENG, L.; et al. Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice. **Food Chemistry.** v.115, p.581-284, 2009.

ZHAO, J. G.; KAN, Z.; LI, Z.; et al. Characterization and immunostimulatory activity of an (1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-glucan from the root of *Ipomoea batatas*. **Int. Immunopharmacol.** v.5, p.1436–1445, 2005.

ZHU, F. M.; DU, B.; BIAN, Z. X.; et al. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities. **Journal of Food Composition and Analysis.** v.41, p.165-173. 2015.