

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

**ANA DANIELA COUTINHO VIEIRA**

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE MEMANTINA, DONEPEZIL E  
VITAMINA D EM CAMUNDONGOS FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS E  
SUBMETIDAS AO MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA DO TIPO  
ALZHEIMER**

**CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2019.**

**ANA DANIELA COUTINHO VIEIRA**

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE MEMANTINA, DONEPEZIL E  
VITAMINA D EM CAMUNDONGOS FÊMEAS OVARIECTOMIZADAS E  
SUBMETIDAS AO MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA DO TIPO  
ALZHEIMER**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josiane Budni

**CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2019.**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha família, minha mãe, meu pai e meu irmão, aqueles que são a base da construção dos meus princípios e valores, com quem sei que posso contar em qualquer desafio e com quem comemoro cada vitória, pois são fontes inesgotáveis de apoio e amor.

Agradeço ao meu namorado, Celo, por todo o apoio, paciência e amor dedicados durante esta fase e em tantas mais. Meus sonhos mais lindos são os nossos, e torná-los realidade ao seu lado é a definição de felicidade.

Agradeço a minha orientadora, Josi, por toda a dedicação e por compartilhar mais que seu conhecimento, compartilhar vivências e emoções que marcaram a minha vida profissional de forma muito especial. Você é uma pessoa brilhante, uma profissional admirável e uma amiga genuína.

Agradeço a equipe do laboratório de Neurologia Experimental, em especial aos alunos de iniciação científica Anita, Nathália, Natalia, Gabriel, Camilla, Renata, Fernanda, Alexia, Matheus, Maylton e Andrea, que dedicaram tantos momentos a execução deste projeto e, sem os quais ele definitivamente não teria se concretizado.

E, por último, mas com certeza não menos importante, agradeço a Duda por toda a dedicação a esse projeto, por tê-lo tornado seu também. Os desafios, as angústias, os momentos de desespero e os de sucesso fizeram mais do que criar uma admiração eterna por você, criaram uma amizade pra levar além. Obrigada!

“Essa tristeza significava: chegamos à última estação.

Essa felicidade significava: estamos juntos.

A tristeza era a forma e a felicidade, o conteúdo.”

*A Insustentável Leveza do Ser – Milan Kundera*

## RESUMO

O período pós-menopausa é caracterizado por uma diminuição acentuada da oferta hormonal de estrogênio no organismo feminino e este período pode prolongar-se com o aumento da expectativa de vida. Esse declínio é associado a diversas doenças neurodegenerativas, entre elas a Doença de Alzheimer (DA). Visto que a DA não possui até os dias atuais um tratamento com notável eficiência na reversão dos danos cognitivos causados pela patologia, cada vez mais, buscam-se novas alternativas terapêuticas. A vitamina D tem se destacado nesse sentido devido a seu efeito neuroprotetor, podendo ser usada em associação com fármacos pré-existentes como a memantina e o donepezil, visando potencializar seus efeitos. Essa abordagem é ainda mais interessante quando associada a modelos animais de menopausa, como através de ovariectomia (OVX), uma vez que as mulheres no período pós-menopausa compõem a prevalência de indivíduos acometidos pela DA. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da vitamina D associada a memantina e donepezil na proteção neurológica comportamental e imunológica, em camundongos fêmeas submetidas à OVX, com privação de estrogênio por 5 meses, e submetidas a um modelo animal de demência tipo DA induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-42 ( $A\beta$ 1-42). Foram utilizados camundongos *Balb/c* fêmeas com 8 meses de vida, divididos em 5 grupos experimentais (1 - *Sham* + fluido cefalorraquidiano artificial [ACSF] + água; 2 - *Sham* +  $A\beta$ 1-42 + água; 3 - OVX + ACSF + água; 4 - OVX +  $A\beta$ 1-42 + água; 5 - OVX +  $A\beta$ 1-42 + vitamina D + memantina + donepezil), que receberam tratamento de 17 dias com vitamina D + memantina + donepezil ou água. Ao final do protocolo experimental, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de labirinto radial, labirinto em Y e habituação ao campo aberto. Após, os animais sofreram eutanásia no 18º para a retirada de estruturas cerebrais como o hipocampo e córtex frontal para a análise dos níveis de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-4) e de fatores neurotróficos (BDNF) e soro para a análise dos níveis de estrogênio (E2) e vitamina D. Os resultados mostram que os grupos OVX apresentam níveis reduzidos de E2 e o grupo com o triplo tratamento apresentou níveis elevados de vitamina D. Os resultados também demonstraram que a administração do peptídeo  $A\beta$ 1-42 juntamente com a OVX induziu a danos de memória espacial de curto e longo prazo e de memória de habituação, além de induzir a reduções dos níveis de BDNF e IL-4 no hipocampo, bem como aumentar os níveis de TNF $\alpha$  no hipocampo e de IL-1 $\beta$  no hipocampo e no córtex frontal dos animais. Em contrapartida, o tratamento de associação tripla reverteu os efeitos de dano a memória espacial de longo prazo e de habituação, assim como reverteu as alterações nos níveis de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-4 no hipocampo dos animais tratados. Concluindo que a associação terapêutica com vitamina D apresenta efeitos benéficos em parâmetros de memória e inflamação em camundongos fêmea submetidos a OVX e ao modelo de demência tipo AD.

Palavras-chave: Alzheimer, ovariectomia, vitamina D, memantina, donepezil, memória.

## ABSTRACT

The postmenopausal period is characterized by a marked decrease in the hormonal supply of estrogen in the female organism and this period can be prolonged with increased life expectancy. This decline is associated with several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). Since AD doesn't have a treatment with remarkable efficiency in reversing the cognitive damage caused by the pathology, new therapeutic alternatives are necessary. Vitamin D has been highlighted in this way due to its neuroprotective effect and can be used in combination with pre-existing medications, such as memantine and donepezil, to improve their effects. This approach is even more interesting when associated with animal models of menopause, such as through ovariectomy (OVX), since women in the postmenopausal period are the most affected by AD. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of vitamin D associated with memantine and donepezil on behavioral and immunochemical neurological protection in female mice submitted to OVX for 5 months and subjected to an animal model of AD-induced dementia by the  $\beta$ -amyloid 1-42 (A $\beta$ 1-42). Animals were divided into 5 experimental groups (1 - Sham + artificial cerebrospinal fluid [ACSF] + water, 2 - Sham + A $\beta$ 1-42 + water, 3 - OVX + ACSF + water; 4-OVX + A $\beta$ 1-42 + water; 5-OVX + A $\beta$ 1-42 + vitamin D + memantine + donepezil), who received 17 days of vitamin D + memantine + donepezil or water treatment. At the end of the experimental protocol, animals were subjected to behavioral tests of radial maze, Y maze and habituation to open field. Afterwards, the animals underwent euthanasia at 18<sup>th</sup> for removal of cerebral structures such as hippocampus and frontal cortex for analysis of cytokine levels (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-4) and neurotrophic factors (BDNF) and serum for analysis of estrogen (E2) and vitamin D levels. The results show that OVX groups exhibit reduced levels of E2 and triple treatment group had high levels of vitamin D. Results also demonstrated that administration of the A $\beta$ 1-42 together with OVX induced short- and long-term spatial and habituation memories damage. In addition, induced reduction of BDNF and IL-4 levels in hippocampus, as well as increasing levels of TNF $\alpha$  in hippocampus and of IL-1 $\beta$  in hippocampus and frontal cortex of animals. In contrast, triple-association treatment reversed the effects of long-term spatial and habituation memories damage, as well as reversed changes in TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-4 levels in hippocampus of treated animals. In conclusion, therapeutic association with vitamin D has beneficial effects on memory and inflammation parameters in female mice subjected to OVX and the AD animal model of dementia.

Key words: Alzheimer's, ovariectomy, vitamin D, memantine, donepezil, memory.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de linha do tempo dos procedimentos cirúrgicos representada em dias.....	27
Figura 2. Esquema de linha do tempo do tratamento e dos testes comportamentais representada em dias.....	27
Figura 3. Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de estrogênio (E2), em camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com $\beta$ A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	33
Figura 4. Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de vitamina D3, em camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com $\beta$ A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	34
Figura 5. Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg), no teste de labirinto radial, em camundongos fêmeas Balb/c ovariectomizadas administradas com $\beta$ A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	35
Figura 6. Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg), no teste de labirinto em Y, em camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com $\beta$ A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	36
Figura 7. Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg), no teste da memória de habituação ao campo aberto, em camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com $\beta$ A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	37
Figura 8. Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de BDNF no hipocampo de camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com $\beta$ A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....	38
Figura 9. Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de TNF $\alpha$ no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de	



camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com  $\beta$ A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....39

Figura 10. Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de IL-1 $\beta$  no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com  $\beta$ A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....40

Figura 11. Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de IL-4 no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com  $\beta$ A1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA.....41

## LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> - 1 $\alpha$ ,25–diidroxicolecalciferol ou calcitriol.

7-DHC - 7-deidrocolesterol.

ACSF - fluido cerebrospinal artificial.

ApoE - apolipoproteína E.

APP - proteína precursora amilóide.

A $\beta$  - beta amilóide.

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro.

CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa.

ChEI - inibidores da enzima acetilcolinesterase.

DA – Doença de Alzheimer.

D-gal - D-galactose.

E2 – estradiol.

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.

ER $\alpha$  - receptor de estrogênio específico do tipo  $\alpha$ .

ER $\beta$  - receptor de estrogênio específico do tipo  $\beta$ .

FDA - *Food and Drug Administration*.

GABA - ácido gama-aminobutírico.

i.c.v. – intracerebroventricular.

i.m – intramuscular.

IL-1 – interleucina 1.

IL-10 – interleucina 10.

IL-13 – interleucina 13.

IL-1 $\beta$  - interleucina 1 $\beta$ .

IL-4 – interleucina 4.

IL-6 - interleucina 6.

NGF - fator de crescimento nervoso

NK - *Natural Killer Cell*.

NMDA - N-metil-D-aspartato.

OVX – ovariectomia.

Peptídeo A $\beta$  1-42 – peptídeo beta amilóide fração 1-42.

TNF $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$ .

UVB - ultravioleta B.

VDR – *vitamin D receptor*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER .....	13
1.2 MENOPAUSA .....	16
1.3 TRATAMENTOS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER .....	19
1.3.1 Tratamento combinado com fármacos clássicos e Vitamina D.....	21
2. OBJETIVOS .....	25
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. ANIMAIS .....	26
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
3.3 CIRURGIA PARA OVX OU SHAM.....	27
3.4 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL PELA ADMINISTRAÇÃO DO PEPTÍDEO A $\beta$ 1-42 .....	28
3.5 TRATAMENTO REPETIDO .....	29
3.6 ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	29
3.6.1 Labirinto radial .....	29
3.6.2 Labirinto em Y.....	30
3.6.3 Teste de habituação ao campo aberto.....	30
3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS AMOSTRAS OBTIDAS.....	31
3.7.1 Análise dos níveis de vitamina D3 e estrogênio no soro.....	31
3.7.2 Análise dos níveis de citocinas e BDNF.....	31
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4. RESULTADOS .....	33
5. DISCUSSÃO .....	42
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional tende a causar uma mudança demográfica nos próximos anos, aumentando a ocorrência de patologias relacionadas à senilidade, como as demências (Annweiler et al, 2011; Shen e Ji, 2015; Alzheimer's Association, 2017). A *Alzheimer's Association* prevê que no ano de 2050 o número de idosos acima de 65 anos nos Estados Unidos duplicará para cerca de 88 milhões (Alzheimer's Association, 2017). A demência pode ser caracterizada como um declínio intelectual progressivo capaz de comprometer atividades rotineiras (Reitz e Mayeux, 2014; Annweiler, 2016); tendo como principais causas a doença de Alzheimer (DA), doença vascular, demência frontotemporal e esclerose múltipla (Hamdan e Ramos, 2016).

A DA é a causa mais frequente de demência (Vest e Pike, 2013; Reitz e Mayeux, 2014; Lobo et al, 2014; Shen e Ji, 2015; Hernando-Requejo, 2016; Alzheimer's Association, 2017), representando de 60 a 80% dos casos (Zemek et al, 2014; Crous-Bou et al, 2017), sendo reconhecida como uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível (Cai, Hussain e Yan, 2013). Caracteriza-se pela diminuição da capacidade cognitiva de forma gradativa, com comprometimento das habilidades funcionais e comportamentais, apresentando-se como um exemplo de doença relacionada ao envelhecimento (Allegri et al, 2006). Dificilmente ocorre em indivíduos com menos de 60 anos, e quando acontece, geralmente relaciona-se com mutações genéticas bastante específicas (Lobo et al, 2014). Frequentemente, as mulheres são mais acometidas por esta doença do que os homens (Vest e Pike, 2013; Bushra et al, 2014; Lobo et al, 2014).

Mulheres com idade avançada, acima de 60 anos, possuem uma maior prevalência de demências, declínios cognitivos relacionados ao envelhecimento e DA, que o restante da população (Reitz et al, 2011; Alzheimer's Association, 2017; Davey, 2017). A causa para esta predominância feminina ainda não está totalmente esclarecida, e pode ser parcialmente justificada pela maior longevidade feminina, visto que a idade avançada é considerada um fator de risco para a DA (Alzheimer's Association, 2017). Porém, esta justificativa não deve ser considerada de forma privativa, já que algumas teorias associam este risco aumentado à senescência hormonal na menopausa (Bushra et al, 2014). O envolvimento dos hormônios

esteroides sexuais femininos no desenvolvimento da demência (Vest e Pike, 2013) pode ser reforçado pelo aumento da prevalência desta após a ocorrência de ovariectomia bilateral antes da menopausa natural (Davey, 2017).

No âmbito da sociedade, a demência e as perdas cognitivas associadas a ela são preocupações importantes (Reitz e Mayeux, 2014), pois com o aumento da expectativa de vida, o número de pessoas afetadas por estas disfunções cresce exponencialmente (Lobo et al, 2014), concebendo um problema de saúde pública devido ao aumento da necessidade de assistência médica e social e a falta de soluções imediatas em relação à cura ou tratamento eficaz (Bermejo-Pareja et al, 2016).

### 1.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A DA é uma doença neurodegenerativa (Liu et al, 2013; Bermejo-Pareja et al, 2016) que potencializa a ocorrência de demência e consequente perda de autonomia no envelhecimento (Annweiler et al, 2011). Esta patologia possui um início ameno, normalmente representado pelo declínio da memória, da fluência verbal e da capacidade cognitiva (Annweiler et al, 2011; Liu et al, 2013; Lobo et al, 2014). Tais características impactam negativamente nas atividades sociais das pessoas acometidas pela DA (Annweiler et al, 2011).

Sabe-se que a DA pode ocorrer de duas formas distintas. Quando ocorre com início precoce, idade inferior 65 anos, normalmente é acompanhada por alterações genéticas, sendo a presença do alelo E4 do gene da apolipoproteína E (ApoE) o fator de risco genético mais conhecido (Depypere et al, 2016). Já quando acontece após os 65 anos, é considerada de início tardio, sendo esta a forma mais comum (Balin e Hudson, 2014; Reitz e Mayeux, 2014).

A fisiopatologia da DA caracteriza-se, principalmente, pelo acúmulo extracelular de placas senis de peptídeo beta amiloide (A $\beta$ ) no tecido cerebral, juntamente com a ocorrência de emaranhados neurofibrilares intracelulares derivados da hiperfosforilação anormal da proteína tau. Esta é uma proteína do citoesqueleto dos neurônios que tem função estrutural, mantendo os monômeros de tubulina unidos, formando microtubúlos, que modulam a organização funcional do neurônio (Vest e Pike, 2013; Balin e Hudson, 2014; Durk et al, 2014; Lobo et al, 2014; Reitz e Mayeux, 2014; Bermejo-Pareja et al, 2016; Hamdan e Ramos, 2016).

Tais alterações acometem, principalmente, as regiões do hipocampo e córtex cerebral (Vest e Pike, 2013).

O peptídeo A $\beta$  é gerado naturalmente a partir do processo de clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (APP) (Liu et al, 2013; Vest e Pike, 2013; Durk et al, 2014). A APP pode ser metabolizada por duas vias diferentes, sendo que em apenas uma delas há a formação de peptídeos A $\beta$  (Vest e Pike, 2013). Pela via amiloidogênica a proteína precursora é clivada pela enzima  $\beta$ -secretase, liberando duas partículas: a proteína  $\beta$  e o fragmento terminal A $\beta$ , o qual é posteriormente clivado pela enzima  $\gamma$ -secretase e dá origem aos peptídeos A $\beta$  de 40 ou 42 aminoácidos (Liu et al, 2013; Vest e Pike, 2013; Balin e Hudson, 2014). O peptídeo A $\beta$  1-42 é a fração considerada mais patogênica, pois possui maior associação com a formação de oligômeros e placas insolúveis (Balin e Hudson, 2014; Durk et al, 2014), devido, principalmente a sua hidrofobicidade (Durk et al, 2014). Já pela via não amiloidogênica, após a clivagem da APP pela enzima  $\alpha$ -secretase, ocorre a formação de fragmentos de APPs solúveis, mas não de peptídeo A $\beta$  (Vest e Pike, 2013).

Em condições fisiológicas, estes peptídeos são liberados para o meio extracelular (Vest e Pike, 2013) e são eliminados pelas vias de depuração cerebral (Durk et al, 2014). Entretanto, um desequilíbrio entre a produção e a eliminação dos peptídeos A $\beta$  resulta no acúmulo dos mesmos, formando oligômeros que prejudicam as sinapses e, conseqüentemente, levam ao processo neurodegenerativo (Liu et al, 2013; Vest e Pike, 2013; Durk et al, 2014). O prejuízo derivado do acúmulo de placas  $\beta$ -amilóides parece influenciar também na formação de emaranhados neurofibrilares, uma vez que leva a fosforilação da proteína tau (Liu et al, 2013; Morley, 2014).

Além destes achados, outros mecanismos podem estar relacionados com o desenvolvimento da doença, tais como: alterações reacionais da microglia (Vest e Pike, 2013; Reitz e Mayeux, 2014); redução de neurônios e perda de sinapses (Vest e Pike, 2013; Afzal et al, 2014; Reitz e Mayeux, 2014; Hamdan e Ramos, 2016); declínio de fatores de crescimento, como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Budni et al, 2015) e fator de crescimento nervoso (NGF) (Hu et al, 2019), dano oxidativo (Afzal et al, 2014); excitotoxicidade glutamatérgica (Kim et al, 2017) e inflamação (Afzal et al, 2014; Kim et al, 2017). As proposições mais aceitas

atualmente, além da “cascata amilóide” proposta inicialmente por Hardy e Allsop (1991), são a hipótese colinérgica (Bartus et al, 1982) e a hipótese inflamatória (Krstic e Knuesel, 2012). A neuroinflamação, ou seja, processo pelo qual o cérebro responde a injúrias no sistema nervoso central através das células microgliais, destaca-se entre esses mecanismos (Cai, Hussain e Yan, 2013; Heppner et al, 2015).

Estudos prévios mostram que o tecido cerebral acometido pela DA demonstra evidências de inflamação relacionada ao acúmulo do peptídeo A $\beta$ , possivelmente associando a hiperativação da microglia durante a formação de placas A $\beta$  e a progressão da DA (Minter, Taylor e Crack, 2015; Hung e Fu, 2017; Sochocka, Zwolińska e Leszek, 2017). A ativação da microglia pela via de formação dos peptídeos A $\beta$  pode acarretar em uma produção anormal de citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6). Estas citocinas elaboram um papel importante na fisiopatologia da DA e de outras doenças neurodegenerativas ligadas ao envelhecimento (Cai, Hussain e Yan, 2013; Ferreira et al, 2014; Minter, Taylor e Crack, 2015; Sochocka, Zwolińska e Leszek, 2017). A IL-1 $\beta$  destaca-se como um dos principais agentes nesse processo (Chen et al, 2016), pois aumenta a proliferação de linfócitos T e B e estimula a atividade células NK (*Natural Killer Cell*) visando a eliminação do processo prejudicial, além de induzir a produção de outras citocinas como TNF $\alpha$  e IL-6 que, por sua vez, têm efeitos secundários em outras células (Barrientos et al, 2016) e são considerados as principais citocinas pró-inflamatórias, sendo configurados como marcadores clássicos de neuroinflamação (Latta, Brothers e Wilcock, 2015; Chen et al, 2016).

Em situações fisiológicas, este processo é controlado e culmina no recrutamento de células imunitárias para o local e resolução do processo inflamatório (Minter, Taylor e Crack, 2015), através da remoção do estímulo deletério e da manutenção da homeostase (Chen et al, 2016). Porém, na DA a presença excessiva de peptídeos A $\beta$  e proteínas tau hiperfosforiladas induzem uma resposta inflamatória excessiva, induzindo uma produção maior de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Minter, Taylor e Crack, 2015).

Entretanto, a relação entre os agentes anti-inflamatórios e pró-inflamatórios na DA ainda é bastante ambígua (Jevtic et al, 2017), pois mesmo sabendo-se que



os mediadores inflamatórios aumentam diversos mecanismos neurodegenerativos, e que as citocinas podem ter propriedades tóxicas diretas, outras podem desempenhar papéis protetores (Chitnis e Weiner, 2017). Desta forma, não é apenas o aumento das citocinas pró-inflamatórias (como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) que influencia nestas doenças, visto que o desequilíbrio entre substâncias pró e anti-inflamatórias (como as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13), também é prejudicial (Cai, Hussain e Yan, 2013). Quando há uma desregulação nos mecanismos inflamatórios pode ocorrer a conversão de um estado de inflamação aguda para crônica, resultando em uma resposta que leva a um prejuízo tecidual (Chen et al, 2016), além de prejudicar o sistema de eliminação de proteínas anormais, ocasionando neurodegeneração e resultando em declínio cognitivo (Heppner, Ransohoff, & Becher, 2015; Sochocka, Zwolińska e Leszek, 2017). À vista disso, a disfunção do sistema imunológico pode ser um fator primário no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a DA (Jevtic et al, 2017).

Da mesma forma, a inflamação pode repercutir negativamente na neurôgenese através, por exemplo, da redução de produção e função do BDNF, via citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ ) (Chen et al, 2016). O BDNF é um fator neurotrófico clássico, amplamente expresso no sistema nervoso central, com destaque para o hipocampo (Zhao, Woody e Chhibber, 2015), capaz de proteger os neurônios e as células da glia contra a excitotoxicidade e outros processos neurodegenerativos (Cabezas et al, 2018), regular a sobrevivência, diferenciação e plasticidade neuronal (Barrientos et al, 2016; Tanila, 2017; Hu et al, 2019), além de reduzir o estresse oxidativo e a morte celular (Hu et al, 2019). Em reforço, mostrou-se que a suplementação de BDNF é capaz de atenuar parâmetros de inflamação, especialmente através da diminuição da expressão de IL-1 $\beta$  (Chen et al, 2016). Além do mais, o BDNF é bastante significativo na DA, pois seus níveis costumam apresentar-se diminuídos com a idade e progressão da doença (Zhao et al, 2017; Hu et al, 2019).

## 1.2 MENOPAUSA

Em conjunto com o aumento da expectativa de vida populacional, milhões de mulheres passarão cerca de um terço, ou mais, de suas vidas após a ocorrência da menopausa (Lobo et al, 2014). A menopausa natural pode ser descrita como um evento de alterações hormonais, especialmente caracterizado pelo declínio dos

níveis de estrogênio, levando à cessação permanente da ovulação e da menstruação, ocasionando inabilidade reprodutiva (Takahashi et al, 2015; Davey, 2017; Siebert et al, 2017).

Os efeitos decorrentes da menopausa são dependentes do momento em que ela ocorre, posto que durante a transição da menopausa natural podem ocorrer decréscimos discretos em relação à atenção, porém sem ligação comprovada com afecções à memória (Lobo et al, 2014). A idade média do episódio natural é considerada entre 45 e 55 anos, podendo também acontecer de forma extemporânea. Caracteriza-se como menopausa prematura quando esta ocorre em idades inferiores a 45 anos (Davey, 2017; Siebert et al, 2017), de forma espontânea ou em decorrência de intervenções médicas como tratamentos por quimioterapia e radiação ou induzidas cirurgicamente através de ovariectomia, ambas estando ligadas a expansão do risco de comprometimento cognitivos e demências (Lobo et al, 2014; Siebert et al, 2017).

A menopausa precoce tem sido considerada um agravo em relação ao risco de desenvolvimento de doenças neurológicas e perda cognitiva, porém os mecanismos responsáveis por essa associação ainda não são totalmente compreendidos (Siebert et al, 2017). Acredita-se, que a exaustão dos hormônios esteroides sexuais femininos, especialmente o estrogênio, são consequências naturais do envelhecimento, porém elevam a vulnerabilidade a doenças relacionadas aos tecidos sensíveis a estes hormônios, como ossos, tecidos do sistema cardiovascular e do cérebro (Lobo et al, 2014).

Consta que os estrógenos, especialmente o estradiol (E2) (Hansberg-Pastor et al, 2015), promovem efeitos neurotróficos no tecido cerebral, com relação indireta de manutenção das funções cognitivas, e sua deficiência pode estar relacionada a deficiências de memória e aprendizado (Siebert et al, 2017). Um dos possíveis mecanismos envolvidos nestas características é a ação dos hormônios esteróides sexuais durante o período de desenvolvimento neural, resultando em diferenças críticas entre o cérebro feminino e o masculino (Vest e Pike, 2013). Também são citadas as diferenças em relação a forma como o declínio hormonal ocorre entre os sexos, sendo geralmente mais gradual nos homens (Vest e Pike, 2013).

O E2 é um hormônio derivado do colesterol e sua função mais conhecida envolve a regulação dos processos reprodutivos, mas ele também exerce efeitos nas funções cognitivas (Hansberg-Pastor et al, 2015). É capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e interagir com receptores de estrogênio específicos do tipo  $\alpha$  e  $\beta$  (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ), além de ser sintetizado no cérebro, em neurônios e células gliais (Hansberg-Pastor et al, 2015). Os receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  são predominantemente expressos em áreas do cérebro ligadas a cognição, especialmente no hipocampo, e o ER $\beta$ , em particular, parece estar relacionado com a plasticidade neural relacionada com o BDNF (Zhao, Woody e Chhibber, 2015), neurotrofina que tem suas concentrações séricas diminuídas significativamente após a menopausa (Cubeddu et al, 2010).

Ademais, uma das descobertas mais significativas relacionando o E2 a DA é a capacidade de redução da formação de peptídeo A $\beta$ , uma vez que este hormônio modifica o processamento da APP estimulando a utilização da via não amiloidogênica (Vest e Pike, 2013). Sabe-se que mulheres com DA apresentam níveis mais baixos de E2 circulante e cerebral, se comparadas com mulheres que não apresentam a doença (Vest e Pike, 2013). Estudos também relacionam o esgotamento hormonal pós-ovariectomia com o aumento do acúmulo de peptídeo A $\beta$  em roedores e destacam que tal alteração pode ser revertida pela administração de estrogênio exógeno (Vest e Pike, 2013).

Para o tratamento dos sintomas relacionados a menopausa, seguidamente as mulheres recorrem ao uso de terapia de reposição hormonal (Vest e Pike, 2013; Siebert et al, 2017). Existem relatos de benefícios decorrentes desta terapia em relação à memória, cognição e a diminuição da ocorrência de DA, doença cerebrovascular e demência (Rocca et al, 2011; Davey, 2017), apesar de não ser uma alternativa indicada para melhorias cognitivas em mulheres com DA (Hogervost et al, 2009).

Entretanto, os resultados do tratamento de reposição hormonal são controversos (Vest e Pike, 2013; Lobo et al, 2014), pois também são relatadas associações à predisposição de tumores, doenças cardiovasculares (Siebert et al, 2017) e ao aumento do risco de demências (Shumaker et al, 2003). Um estudo realizado pelo *Women's Health Initiative Memory Study* indica que a reposição hormonal em mulheres com mais de 65 anos duplica o risco de demência

(Shumaker et al, 2003; Vest e Pike, 2013), enquanto que quando utilizada logo após a menopausa cirúrgica em mulheres mais jovens ou durante a meia idade está relacionado a diminuição do risco de desenvolvimento de DA (Lobo et al, 2014).

Devido a esta ambiguidade, e ao fato de saber-se que o estrogênio possui efeitos benéficos, neutros e deletérios no cérebro humano (Davey, 2017), a tríade de ovariectomia, terapia de reposição hormonal e DA tem chamado a atenção por muitos anos (Bushra et al, 2014). Uma hipótese de grande relevância refere-se a “janela de oportunidade” para o tratamento em mulheres menopausadas (Vest e Pike, 2013; Bushra et al, 2014; Lobo et al, 2014; Kantartci et al, 2016). Acredita-se que o melhor momento para o início da reposição hormonal é imediatamente após a menopausa, acarretando em atenuação e, até mesmo, prevenção das doenças crônicas que se manifestam após a ocorrência da cessação menstrual (Lobo et al, 2014), podendo levar a efeitos prejudiciais se iniciada em um período mais tardio, a partir de 10 anos após o evento (Bushra et al, 2014).

Entende-se que, no período imediatamente após a menopausa, a administração de E2 exógeno possui ação direta no cérebro, prevenindo o depósito de peptídeo A $\beta$  e da proteína Tau, desta forma, contribuindo para a prevenção de DA e demência (Kantartci et al, 2016). Além disso, previne o desenvolvimento de aterosclerose nos vasos sanguíneos cerebrais (Davey, 2017). Porém, em mulheres pós-menopausadas a longo tempo, ocorre uma diminuição dos ER $\alpha$  de estrogênio devido ao declínio na produção deste hormônio (Craig e Murphy, 2010; Smith et al, 2010), prejudicando assim a eficácia da terapia.

Assim sendo, ainda é necessária a busca por alternativas eficazes para o tratamento dos efeitos cognitivos deletérios da privação de E2 após a menopausa, assemelhando-se ao cenário atual da DA em que, apesar dos esforços, ainda carece de um tratamento efetivo em prejuízos de memória e cognição (Annweiler, 2011)

### 1.3 TRATAMENTOS PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Atualmente, somente quatro medicamentos são aprovados e comercializados para o tratamento da DA (Graham, Bonito-Oliva e Sakmar, 2017; Kim et al, 2017). Destes, três fármacos (donepezil, galantamina e rivastigmina) são inibidores da enzima acetilcolinesterase (ChEI) (Zemek et al, 2014) e atuam nas vias

colinérgicas do sistema nervoso central, com atividade anticolinesterárgica e, no caso da galantamina, também agindo como modulador alostérico dos receptores nicotínicos de acetilcolina (Graham, Bonito-Oliva e Sakmar, 2017). Estes medicamentos são aprovados para demência leve a moderada (Zemek et al, 2014; Boinpally, 2015) e visam compensar a afinidade do peptídeo A $\beta$  pelo sistema colinérgico, que causa a diminuição da atividade colinérgica no cérebro e mantém níveis exacerbados de acetilcolina nas sinapses (Annweiler et al, 2012b, Kim et al, 2017).

Outro fármaco, a memantina, voltado para DA moderada a severa, é um antagonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Zemek et al, 2014; Boinpally, 2015). Visto que o excesso de glutamato nas sinapses excitatórias na DA (Annweiler et al, 2012b, Kim et al, 2017) e, conseqüentemente, a excitotoxicidade envolvida, parecem ser decorrentes da diminuição da receptação de glutamato pela microglia (Graham, Bonito-Oliva e Sakmar, 2017), a memantina atua nas vias glutamatérgicas bloqueando receptores NMDA (Graham, Bonito-Oliva e Sakmar, 2017).

Porém a efetividade destes fármacos é limitada. Apesar dos inúmeros esforços e estudos voltados a terapias para a DA, esta patologia ainda carece de tratamentos efetivos, pois as drogas atualmente aprovadas não apresentam evidências claras tanto em relação a segurança a longo prazo, quanto a eficácia do tratamento, visto que nenhum dos fármacos modifica os processos patológicos primários da doença ou evitam a sua progressão, apesar de fornecerem um alívio sintomático (Annweiler et al, 2012a; Matsuzono et al, 2015; Crous-Bou et al, 2017; Graham, Bonito-Oliva e Sakmar, 2017; Hung e Fu, 2017). Desta forma, funcionando mais como um tratamento paliativo visando o retardo da perda de qualidade de vida do paciente, posto que diminuem o declínio cognitivo e, por conseguinte, retardam a perda de independência (Annweiler et al, 2012a; Graham, Bonito-Oliva e Sakmar, 2017).

Além disso, já demonstrou-se que a administração destes fármacos pode estar associada a efeitos adversos. Relata-se que os ChEIs, em especial o donepezil, pode causar reações como tontura, vômito, diarreia, constipação, cefaleia, distúrbios do sono (Zemek et al, 2014; Greig, 2015). Já a administração de memantina pode ocasionar, além de cefaleia, diarreia e constipação, quedas,

infecções do trato urinário, depressão, aumento do peso corporal, sonolência, dores nas costas, dores abdominais e redução dos níveis de hemoglobina, sendo este último efeito uma anormalidade de importância clínica (Greig, 2015).

Sendo assim, as estratégias em busca de substâncias eficazes e curativas para a DA tem sido acompanhada pela investigação de formas de prevenção com foco em populações de risco (Graham, Bonito-Oliva e Sakmar, 2017). Outra potencial solução seria o foco em tratamentos com múltiplos alvos, ou associação farmacológica (Matsuzono et al, 2015), objetivando as diversas vias que podem levar a neurodegeneração (Annweiler et al, 2012a; Singh et al, 2015). A combinação de ChEIs e memantina tem sido estudada e é considerada o padrão ideal na abordagem atual de tratamento (Greig, 2015) e os resultados mostram que a combinação de memantina com donepezil parece ser mais eficaz (Zemek et al, 2014) que outras combinações, como memantina e rivastigmina (Gareri et al, 2014; Greig, 2015).

### 1.3.1 Tratamento combinado com fármacos clássicos e Vitamina D

Buscando minimizar os sintomas derivados da DA, o desenvolvimento de novas estratégias no âmbito terapêutico é imprescindível (Annweiler et al, 2011), visto que o tratamento da DA ainda carece de uma droga, fármaco ou substância com eficácia para o combate à doença (Shen e Ji, 2015; Landel et al, 2016). Uma das alternativas em voga é a busca por substâncias com propriedades neuroprotetoras, preferencialmente, já aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e com toxicidade conhecida, para facilitar o alcance dos pacientes com DA (Landel et al, 2016).

Ainda neste sentido, acredita-se que através da minimização dos fatores de risco e da promoção de fatores protetores, a DA e a demência podem ser prevenidas ou retardadas (Davey, 2015). Por isso, uma das alternativas com ênfase para a redução da incidência desta enfermidade é a modulação dos fatores de risco modificáveis (Shen e Ji, 2015; Bermejo-Pareja et al, 2016), pois sabe-se que a demência não está apenas ligada a fatores genéticos, mas também diretamente relacionada a fatores predisponentes ambientais, sendo estes eventualmente mais passíveis de modificações, como por exemplo, a dieta (Hernando-Requejo, 2016).

Toda deficiência nutricional em pacientes com comprometimento cognitivo deve ser tratada, entretanto, quando se busca a prevenção e a redução estatística dos casos tal abordagem deve ser feita em pacientes ainda saudáveis (Hernando-Requejo, 2016). Atualmente, vínculos entre a vitamina D e a DA têm se destacado, pois a deficiência desta vitamina é prevalente, tanto em portadores de DA, como de demências em geral (Afzal et al, 2014; Morley, 2014; Shen e Ji, 2015; Landel et al, 2016). Estudos também demonstram que níveis elevados de 25-hidroxivitamina D relacionam-se a melhores desempenhos em testes cognitivos (Landel et al, 2016).

A vitamina D é um hormônio esteroide solúvel em gordura (Shen e Ji, 2015; Landel et al, 2016) com capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Dursun, Gezen-Ak e Yilmazer, 2011; Annweiler et al, 2014) e notável atividade no metabolismo de regulação do cálcio (Annweiler, 2016). Sua versão metabolicamente ativa é representada pela  $1\alpha,25$ -diidroxicolecalciferol (calcitriol ou  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) e tem sua origem a partir de duas moléculas precursoras inativas: a vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) e a vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) (Barral, 2007). Enquanto a vitamina D<sub>2</sub> pode ser obtida apenas a partir da dieta, especialmente de produtos de origem vegetal; a vitamina D<sub>3</sub> pode ser obtida tanto da dieta, quanto produzida de forma endógena (Kennel, 2010). A produção de D<sub>3</sub> pelo corpo ocorre a partir do precursor lipídico 7-deidrocolesterol (7-DHC), presente naturalmente na epiderme e que ao entrar em contato com a radiação ultravioleta B (UVB) proveniente da exposição solar, transforma-se em vitamina D<sub>3</sub> (Landel et al, 2016; Mpandzou et al, 2016). Tanto a vitamina D<sub>2</sub> quanto a D<sub>3</sub> passam por um processo de hidroxilação no fígado, transformando-se em 25-hidroxivitamina D (calcidiol) (Kennel, 2010). O calcidiol é transportado para os rins, ou outros tecidos com ação da enzima  $1\alpha$ -hidroxilase, onde é novamente hidroxilado e dá origem a vitamina D ativa, a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , ou calcitriol (Kennel, 2010; Landel et al, 2016; Mpandzou et al., 2016). Em situações em que a exposição solar é deficiente, o organismo necessita da ingestão de vitamina D através da dieta, seja na forma de vitamina D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub> (Landel et al, 2016).

A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (vitamina D ativa) age nas células alvo através de receptores nucleares específicos para vitamina D (VDR – *vitamin D receptor*) (Annweiler, 2016; Landel et al, 2016). Através desses receptores, além da regulação do metabolismo ósseo, a vitamina D exerce funções biológicas em outros locais,

como o sistema nervoso central (Dursun, Gezen-Ak e Yilmazer, 2011; Annweiler, 2016). Este receptor encontra-se vinculado aos neurônios e nas células da glia (Annweiler, 2016), especialmente nas regiões ligadas a cognição, como hipocampo, hipotálamo, córtex e subcórtex (Annweiler et al, 2014).

Sabe-se que a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sérica é capaz de atingir o líquido cefalorraquidiano ao ultrapassar a barreira hematoencefálica, mas evidências comprovam que algumas células cerebrais, como neurônios e células gliais, possuem a capacidade de produção da enzima  $1\alpha$ -hidroxilase (Mpandzou et al., 2016), necessária para a hidroxilação e formação da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  internamente (Dursun, Gezen-Ak e Yilmazer, 2011; Annweiler, 2016), especialmente em áreas relacionadas com distúrbios neurodegenerativos (Dursun, Gezen-Ak e Yilmazer, 2011). Desta forma, a presença de enzimas e receptores envolvidos no metabolismo da vitamina D em áreas específicas do cérebro, reforça a hipótese de ações neurosteróides da vitamina D (Annweiler, 2016), tanto na regulação do desenvolvimento quanto da função cerebral (Mpandzou et al., 2016).

A vitamina D é capaz de regular a expressão de proteínas estruturais, fatores neurotróficos (Annweiler, 2016) e neurotransmissores deficientes em doenças neurodegenerativas (Mpandzou et al., 2016), como acetilcolina, dopamina, serotonina e GABA (ácido gama-aminobutírico) (Annweiler, 2016). Também relaciona-se com a atenuação da inflamação relacionada à senescência natural e do acúmulo de peptídeo  $\text{A}\beta$  através de estímulo à fagocitose e depuração (Annweiler, 2016). Além disso, é capaz de realizar o controle dos canais de cálcio com tensão reduzida (Annweiler, 2016), contribuindo para a homeostase de cálcio intraneuronal e evitando a necrose, além de apresentar características neuroprotetoras antioxidantes em relação à toxicidade glutamatérgica (Annweiler, 2016), evitando a apoptose. Fatos estes que podem se relacionar com a fisiopatologia da DA, que está parcialmente ligada à toxicidade tanto do cálcio, quanto do glutamato (Annweiler, 2011).

Vale destacar que a incidência de déficit de vitamina D em idosos é significativa (Annweiler et al, 2014) e pode estar relacionada a menor exposição solar, redução da ingestão através da dieta e a menor disponibilidade de 7-DHC (Mpandzou et al., 2016). Com base nestas características, e nos relatos de que o déficit cognitivo pode ser associado à hipovitaminose D, é possível supor que a



reversão da deficiência deste nutriente pode ser um fator contribuinte para a melhora do declínio cognitivo. Além disso, seus efeitos benéficos podem ser combinados a medicamentos já utilizados para tratamento de demências, contribuindo para um tratamento de drogas múltiplas e uma possível potencialização de efeitos benéficos (Annweiler et al, 2012b).

Com base nisso, novas abordagens terapêuticas vêm sendo estudadas visando a utilização desta vitamina, de forma isolada (Briones e Darwish, 2012) ou em associação com outras substâncias (Annweiler et al, 2011) como resveratrol (Cheng et al, 2016), memantina (Annweiler et al, 2012), apresentando efeitos positivos, como aumento da depuração de peptídeo A $\beta$  (Briones e Darwish, 2012), melhora na capacidade cognitiva (Annweiler et al, 2012) e redução da citotoxicidade induzida pela DA (Cheng et al, 2016).

### **Justificativa**

Apesar de pesquisas prévias demonstrarem o potencial neuroprotetor da vitamina D, além de suas contribuições em processos de memória, os mecanismos pelos quais esses benefícios acontecem ainda são obscuros, gerando a necessidade de maiores investigações acerca deste potencial e dos mecanismos envolvidos no processo, especialmente quando relacionamos a ocorrência de menopausa. Ademais, a associação a fármacos pré-existentes parece ser uma alternativa relevante na busca por novas estratégias terapêuticas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com vitamina D associada com memantina e donepezil em camundongos fêmeas submetidas à ovariectomia (OVX) e ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo A $\beta$ 1-42.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da suplementação com vitamina D associada com memantina e donepezil em camundongos fêmeas ovariectomizadas e submetidas ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo A $\beta$ 1-42 nos níveis de estrogênio e vitamina D.

- Avaliar o efeito da suplementação com vitamina D associada com memantina e donepezil em camundongos fêmeas ovariectomizadas e submetidas ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo A $\beta$ 1-42 nos testes comportamentais de labirinto radial, labirinto em Y e habituação ao campo aberto;

- Avaliar o efeito da suplementação com vitamina D associada com memantina e donepezil em camundongos fêmeas ovariectomizadas e submetidas ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo A $\beta$ 1-42 nos níveis das citocinas interleucina 1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), IL-4 e do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), no córtex frontal e hipocampo.

- Avaliar o efeito da suplementação com vitamina D associada com memantina e donepezil em camundongos fêmeas ovariectomizadas e submetidas ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo A $\beta$ 1-42 nos níveis de BDNF no hipocampo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Balb/c* fêmeas com 8 meses de idade procedentes do biotério da UNESC pesando aproximadamente 25 a 30g. Os camundongos ficaram abrigados em 5 por caixa com acesso a alimento e água *ad libitum* e foram mantidas em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e temperatura de  $23 \pm 1^\circ$  C. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob protocolo 063/2018-2 – Versão 02.

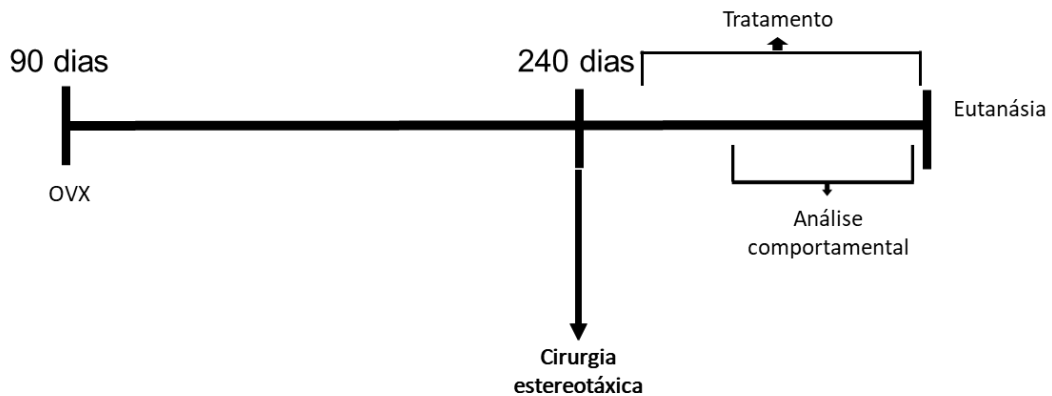
#### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados camundongos *Balb/c* fêmeas com 8 meses de vida após 5 meses da OVX, cada grupo com  $n$  de 8-13 animais considerando uma perda de 30%. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais: três submetidos à OVX e dois grupos Sham, que sofreram cirurgia, porém sem OVX. Após a cirurgia, quando os camundongos completaram 8 meses, estes foram submetidos a administração de peptídeo A $\beta$ 1-42 ou ACSF (fluido cerebrospinal artificial). Passadas 24 horas após a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de A $\beta$ 1-42 ou ACSF, os camundongos foram tratados com vitamina D3 na dose de 420 UI/kg associada a memantina e donepezil ou água via oral por gavagem durante 17 dias. Os grupos experimentais seguiram a seguinte divisão:

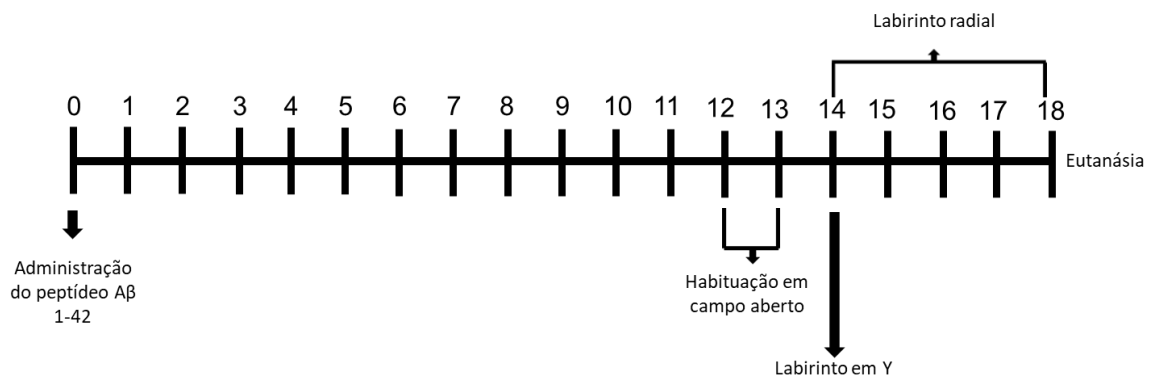
- 1- Sham + ACSF + água;
- 2- Sham + A $\beta$ 1-42 + água;
- 3- OVX + ACSF + água;
- 4- OVX + A $\beta$ 1-42 + água;
- 5- OVX + A $\beta$ 1-42 + vitamina D3 + memantina + donepezil.

No 14° de tratamento, os animais foram submetidos ao teste comportamental do labirinto radial, o qual persistiu por 5 dias para avaliar a memória espacial. Outro grupo independente de animais, no 12° e 13° dias de tratamento, foram submetidos ao teste de memória de habituação ao campo aberto para avaliação da habituação, e no 14° dia, ao teste do labirinto em Y para avaliar a

memória espacial de curto prazo. Após os testes comportamentais os animais sofreram eutanásia.



**Figura 1.** Esquema de linha do tempo dos procedimentos cirúrgicos representada em dias.



**Figura 2.** Esquema de linha do tempo do tratamento e dos testes comportamentais representada em dias.

### 3.3 CIRURGIA PARA OVX OU SHAM

As fêmeas de 3 meses de idade foram anestesiadas com uma mistura de cetamina/xilazina (cetamina: 60 mg/kg e xilazina: 4 mg/kg intramuscular, i.m). Após a desinfecção da pele com clorexidina, uma incisão cutânea na linha média dorsal foi feita caudal na parte posterior das costelas. Usando dissecação sem corte ao túnel subcutâneo, lateral a incisão da pele, os músculos da parede abdominal posterior foram separados para expor a cavidade abdominal. O ovário foi localizado em uma almofada de gordura 1 a 2 cm abaixo dos músculos. A gordura periovariana foi presa com pinça para levantar e exteriorizar o ovário. A trompa de Falópio foi esmagada e o ovário removido por cauterização da área presa. A incisão da pele foi

fechada usando fio de sutura número 6. Os animais controle ou Sham somente passaram pelo procedimento cirúrgico, sem a cauterização dos ovários. Após a cirurgia, as fêmeas foram colocadas em uma gaiola comunitária com acesso *ad libitum* aos alimentos e água, e mantidos em local aquecido com um aquecedor elétrico para se recuperar da anestesia. Foi adicionado 0,2 mg/mL de dipirona sódica na água das garrafas de beber dos animais, disponível *ad libitum* durante 72 horas, para minimizar a dor pós cirúrgica. Posteriormente, para garantir a ausência prolongada de hormônios ovarianos, os animais foram devolvidos às instalações habitacionais durante 5 meses (Rigalli e Loreto, 2009; Fatemi et al, 2018).

### 3.4 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL PELA ADMINISTRAÇÃO DO PEPTÍDEO A $\beta$ 1-42

O peptídeo A $\beta$ 1-42 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi dissolvido numa solução de tampão fosfato (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5) na concentração de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. A solução foi incubada durante 7 dias em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a agregação dos peptídeos A $\beta$ 1-42 em oligômeros (Ueda, Fukui e Kageyama et al, 1994; Resende et al, 2008; Ruiz-Muñoz et al, 2011; Garcez et al, 2017). Após a agregação, a solução foi armazenada a - 20°C até a sua utilização. No dia da administração a solução foi diluída na dose final de 100 pmol/ $\mu$ L em ACSF (NaCl 24 mM, KCl 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2,0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25 mM, 26 mM de NaHCO<sub>3</sub>, glicose 10 mM e sacarose 4 mM). Os animais foram anestesiados com isoflurano (1,5%) utilizando um aparelho de anestesia inalatória. Os oligômeros A $\beta$  foram injetados através de uma agulha de aço inoxidável de calibre 28 com 3 mm de comprimento acoplada a uma seringa de Hamilton. A agulha foi inserida unilateralmente através da pele e do crânio diretamente no ventrículo lateral esquerdo, via intracerebroventricular (i.c.v). A localização do bregma foi realizada pela visualização de um triângulo equilátero, traçando uma linha entre os olhos e a parte superior aos olhos do camundongo, e a partir desse ponto, foi medido 1 mm posterior e 1 mm para lateral esquerda, a agulha inserida nesse ponto a uma profundidade de 2,5 mm (Laursen e Belknap, 1986; Gomes et al, 2013). Os oligômeros A $\beta$  foram injetados no volume de 4  $\mu$ l (400 pmol/sítio) ao longo de um período de 10 segundos, seguido por um atraso de 10 segundos para permitir a total difusão da solução. Após a administração, os animais foram colocados em

uma gaiola comunitária com acesso *ad libitum* aos alimentos e água, e logo se recuperaram da anestesia.

### 3.5 TRATAMENTO REPETIDO

Os animais foram tratados com vitamina D3 (420UI/kg) (Adera®) associada com memantina (5 mg/kg) (Eurofarma®) e donepezil (1 mg/kg) (Eurofarma®) ou água via oral, administrada por gavagem, durante 17 dias. A vitamina D, a memantina e o donepezil foram diluídos em água. As gavagens foram administradas todos os dias às 10h, com auxílio de uma agulha de gavagem, realizada por alunos experientes com o máximo cuidado para evitar o estresse dos animais.

### 3.6 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

#### 3.6.1 Labirinto radial

O aparato do labirinto radial consiste em 8 braços, numerados de 1 a 8 (48 × 12 cm), que se estende radialmente a partir de uma área central (32 cm de diâmetro). O aparelho é colocado a 50 cm acima do chão, e possui formas geométricas posicionadas na reta dos braços nos quais é colocada a recompensa. Esse teste é usado para avaliar a memória espacial de longo prazo. No primeiro dia (14<sup>o</sup> dia de tratamento), os animais foram colocados um de cada vez no aparato para explorar livremente durante 5 minutos, sem recompensa, apenas para se habituarem ao equipamento. Após, retornaram a caixa moradia e foram devolvidas ao biotério com um cereal de chocolate (Nescau Cereal®) por animal em cada caixa moradia, para se habituarem a comida (recompensa), juntamente com a ração padrão do biotério, porém essa foi racionada (2,5 g por animal) para que no dia seguinte (primeiro dia de teste) os animais estivessem com fome para facilitar a realização da tarefa. No primeiro dia de teste (15<sup>o</sup> dia de tratamento) o animal foi colocado novamente no aparato e quatro dos oito braços do labirinto possuíam a recompensa (cereal), e nestes mesmos braços haviam as pistas geométricas. Cada animal teve 10 minutos para realizar a tarefa de encontrar a recompensa nos 4 braços, sendo que, ao encontrar as 4 recompensas ou passados os 10 minutos, eles foram devolvidos à caixa moradia, onde novamente foi realizado o racionamento de comida e eles foram devolvidos ao biotério. Esse procedimento foi realizado da

mesma forma nos 3 dias subsequentes, totalizando 5 dias de teste com intervalos de 24 horas. Os parâmetros avaliados foram: tempo total para encontrar a recompensa nos 4 braços (latência); erros totais (nº de entradas) em cada braço para encontrar a recompensa. Estes parâmetros compõem a memória espacial de longo prazo e o aprendizado dos animais ao longo de 5 dias (Foyet et al, 2011; Hritcu, Cioanca e Hancianu, 2012). Após o término do teste os animais foram submetidos à eutanásia.

### 3.6.2 Labirinto em Y

Este teste avalia a memória espacial de curto prazo e o aprendizado. A memória de reconhecimento espacial dos animais foi investigada usando um labirinto em “Y”. O aparelho feito de acrílico preto possui três braços iguais (50 x 10 x 20 cm, cada braço) afastados em 120° e foi colocado em uma sala com dicas visuais nas paredes para facilitar a localização espacial dos animais. O protocolo consiste em duas sessões separadas por um intervalo de 180 minutos. Na primeira sessão, o animal foi colocado no final de um dos braços, chamado de “braço de partida” (ou start), e teve livre acesso para explorar o “outro braço” (ou other) durante 5 minutos. Nesta sessão inicial, o terceiro braço do labirinto foi bloqueado por uma porta guilhotina e será chamado de “braço novo” (ou novel). O animal foi, então, removido do labirinto e retornou a caixa moradia. Depois de 2 horas, na segunda sessão, o animal foi novamente colocado no “braço de partida” do labirinto para explorar livremente todos os três braços durante 5 minutos. O tempo de permanência em cada braço foi registrado. Os resultados foram expressos pelo tempo em segundos no braço novo e no outro braço (Dellu et al, 1997).

### 3.6.3 Teste de habituação ao campo aberto

No 12º dia de tratamento, os animais foram colocados no aparato de habituação ao campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 9 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino (13º dia de tratamento) na qual se repetiu o procedimento do treino (Vianna et al, 2000). Foram medidos os números

de “cruzamentos” através das linhas pretas e o número de “levantamentos” medidos pelas vezes que o animal permaneceu nas duas patas traseiras, esses parâmetros foram avaliados em ambas as sessões.

### 3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DAS AMOSTRAS OBTIDAS

Os animais foram submetidos à eutanásia no 18º dia do experimento, por deslocamento cervical. Os animais ficaram aguardando a eutanásia na sala ao lado à sala da eutanásia para evitar que sentissem o cheiro do sangue. O córtex frontal e o hipocampo foram dissecados para posteriores análises dos níveis de citocina. O hipocampo também foi utilizado para a análise dos níveis de BDNF. O sangue foi coletado para as análises dos níveis de vitamina D e estrogênio. As amostras foram armazenadas com refrigeração à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Amostras de córtex frontal e hipocampo foram homogeneizadas em tampão fosfato. As citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-4 foram quantificadas por kits de ELISA, em conforme as recomendações do fabricante.

#### 3.7.1 Análise dos níveis de vitamina D3 e estrogênio no soro

As amostras de sangue após coletadas foram centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos. O soro foi separado e estocado a  $-80^{\circ}\text{C}$  realizar as dosagens. Os níveis de vitamina D (25-hidroxivitamina D) e estrogênio foram medidos usando imunoensaio quimioluminescente no sistema BitLab (Abbott Diagnostics). Os valores de vitamina D (25-hidroxivitamina D) e estrogênio foram expressos em ng/mL and pg/mL, respectivamente.

#### 3.7.2 Análise dos níveis de citocinas e BDNF

Amostras de córtex frontal e hipocampo foram homogeneizados em tampão fosfato. Os níveis de citocinas TNF $\alpha$  (Invitrogen, Catalog Number 88-7340), IL-1 $\beta$  (Invitrogen, Catalog Number 88-7013), IL-4 (Invitrogen, Catalog Number 88-7044) e BDNF (Sigma Aldrich, RAB0026) foram quantificadas por kits de imunoensaio enzimático (ELISA), conforme as recomendações do fabricante, descritas a seguir. As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante a noite com o anticorpo de captura. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de lavagem, e em seguida, foram bloqueadas com uma solução de tampão fosfato com albumina 1% durante 1 hora.



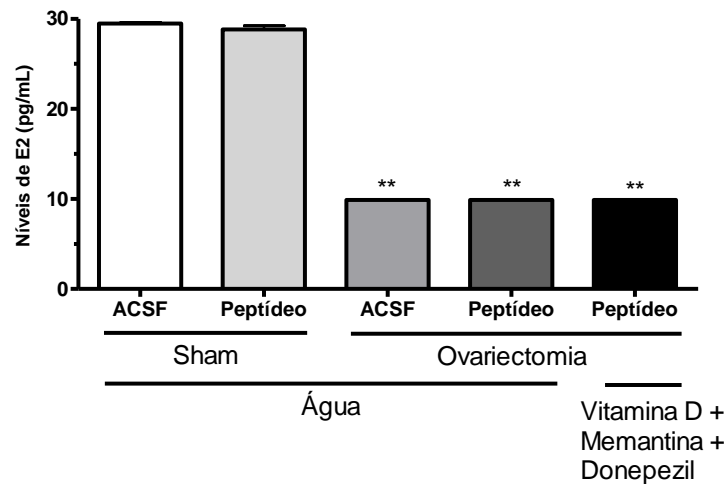
Após, foram incubadas as amostras homogeneizadas e a curva padrão, diluídas em solução tampão, durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e, em seguida, incubadas com anticorpo de detecção por mais 2 horas. Depois das lavagens, foi incubado uma peroxidase conjugada com estreptavidina por 20 minutos, e após o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1), e a reação foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas à 450nm em espectrofotômetro. A proteína total foi mensurada de acordo com o método de Lowry (Lowry et al., 1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados apresentaram uma distribuição normal. Os resultados do teste de labirinto octogonal foram analisados por análise de variância de uma via de medidas repetidas (*repeated measures* via *two-way* ANOVA), seguido do teste de *post hoc Newman-Keuls* quando apropriado. Os dados de memória de habituação do campo aberto e Y-maze foram analisados por teste T de Student. Os dados dos níveis de estrogênio, vitamina D, BDNF e citocinas foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc Newman-Keuls* quando apropriado. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os valores de p são considerados significativos quando  $< 0,05$ .

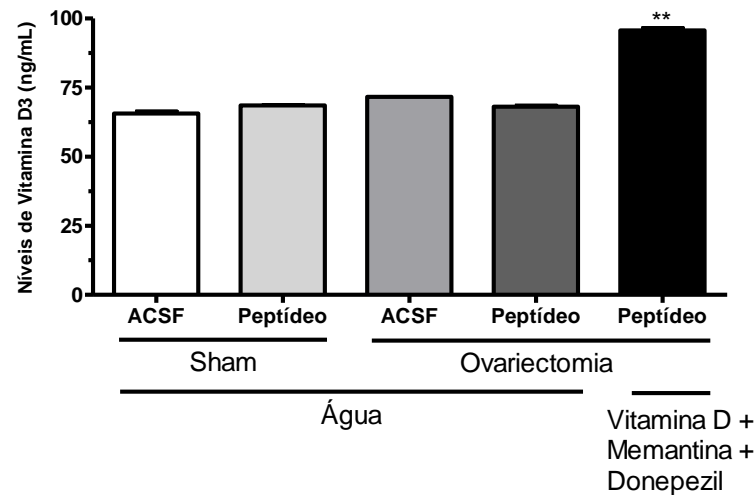
#### 4. RESULTADOS

A figura 3 mostra a dosagem de E2 (estrogênio) dos animais Sham ou OVX. ANOVA de uma via mostrou diferença significativa [ $F(4,25)=521,45$ ,  $p<0,01$ ]. O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou diferença significativa para os grupos OVX, indicando que os animais OVX apresentaram níveis de estrogênio  $\leq 9,9$  pg/ml.



**Figura 3.** Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de estrogênio (E2), em camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com  $A\beta_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais por grupo, \*\* $p<0,01$  quando comparado com ao grupo Sham + ACSF + água.

A figura 4 mostra a dosagem de vitamina D3 dos animais Sham ou OVX. ANOVA de uma via mostrou diferença significativa [ $F(4,22)=57,10$ ,  $p<0,01$ ]. O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou diferença significativa para o grupo OVX +  $A\beta_{1-42}$  + vitamina D + memantina + donepezil, indicando que os animais suplementados com 420 UI/Kg com vitamina D3 apresentaram níveis séricos de vitamina D3 aumentados.

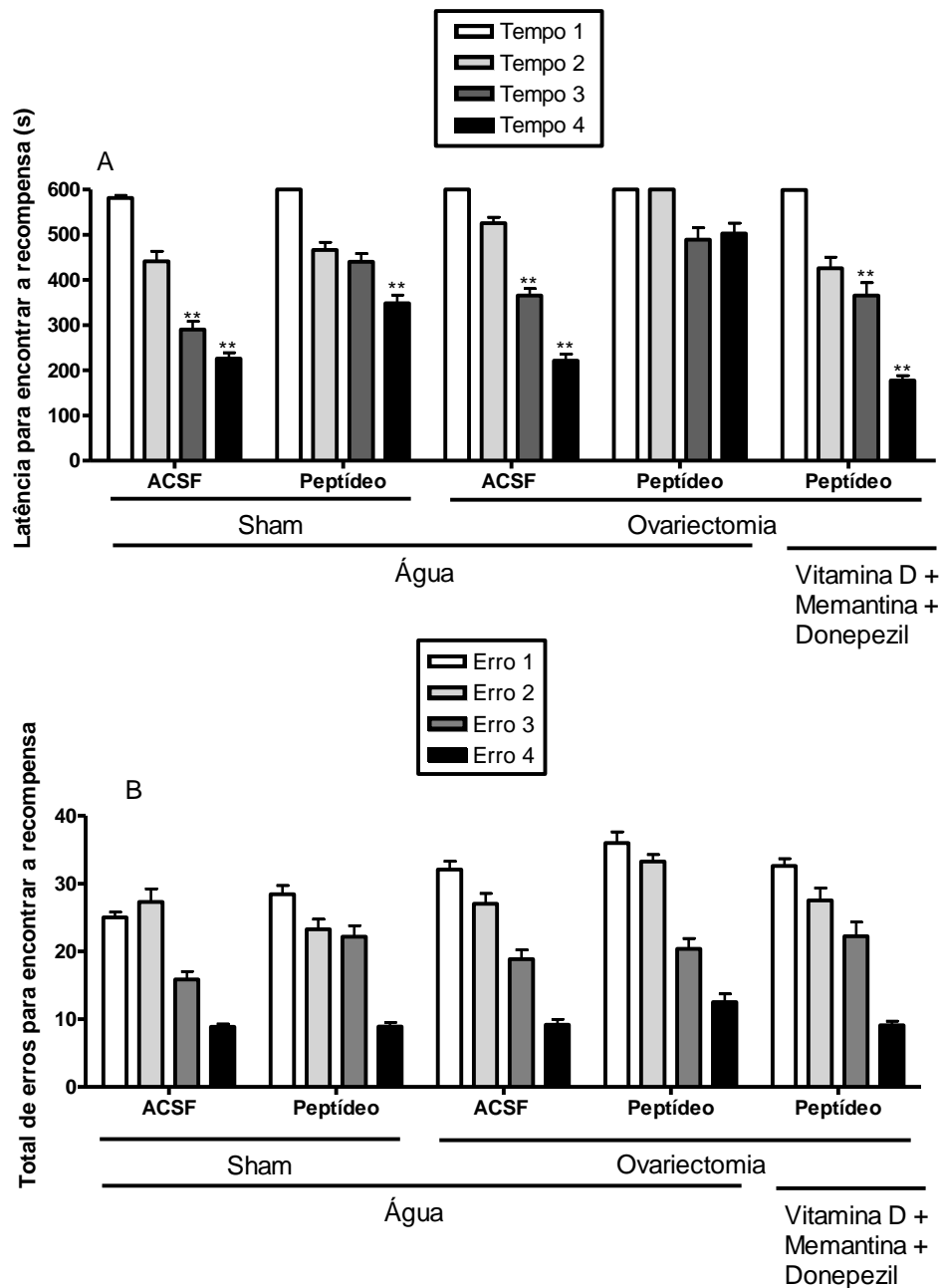


**Figura 4.** Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de vitamina D3, em camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com  $A\beta_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 animais por grupo, \*\* $p < 0,01$  quando comparado a todos os outros grupos.

Os resultados apresentados na figura 5 mostram os dados sobre o labirinto radial. Na figura 5A encontram-se os resultados de latência para encontrar a recompensa. ANOVA de uma via de medidas repetidas mostrou efeito significativo para a interação de todos os grupos [ $F(12,126)=2,09$ ,  $p < 0,05$ ]. O grupo Sham + ACSF + água aprendeu a tarefa no terceiro e quarto dia de teste. Já o grupo Sham +  $A\beta_{1-42}$  + água aprendeu somente no último dia, indicando dano na memória espacial de longo prazo. Os animais do grupo OVX + ACSF + água aprenderam a tarefa no terceiro e quarto dias como no grupo controle (Sham + ACSF + água), indicando que a OVX aparentemente não causou dano na memória espacial de longa duração. Contudo, o grupo OVX +  $A\beta_{1-42}$  + água mostrou dano na memória espacial em todos os dias do teste. Este dano foi maior ao comparar o grupo Sham +  $A\beta_{1-42}$  + água ao grupo OVX +  $A\beta_{1-42}$  + água. Este resultado mostra que a OVX associada ao peptídeo causa maior dano. Foi possível observar que o tratamento com a tripla associação vitamina D + memantina + donepezil foi efetivo em reverter o dano da memória espacial causado pelo peptídeo associado com a OVX. Os animais deste grupo aprenderam já no terceiro dia de treino, como o grupo controle.

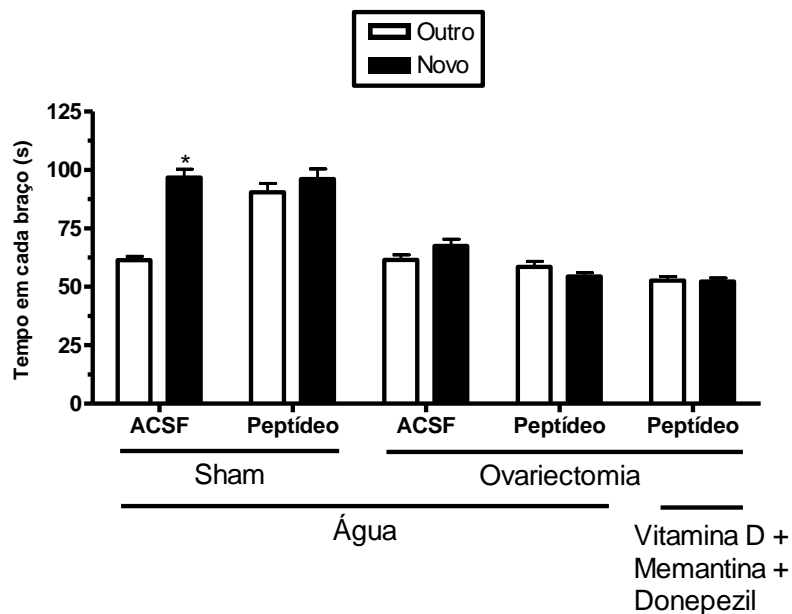
Os resultados ilustrados na figura 5B mostram os dados dos erros que os animais cometeram até encontrarem a recompensa. ANOVA de uma via de medidas

repetidas revelou nenhuma diferença significativa na interação entre os fatores analisados [ $F(12,126)=0,53$ ,  $p=0,05$ ].



**Figura 5.** Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg), no teste de labirinto radial, em camundongos fêmeas Balb/c ovariectomizadas administradas com  $A\beta_{1-42}$  i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura **A** mostra a latência em segundos para encontrar a recompensa nos 4 braços. **B** mostra os erros totais de entrada nos braços antes de encontrar a recompensa nos 4 braços. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 8-11 animais por grupo, \*\* $p < 0,01$  quando comparado dentro do grupo com o primeiro dia de teste.

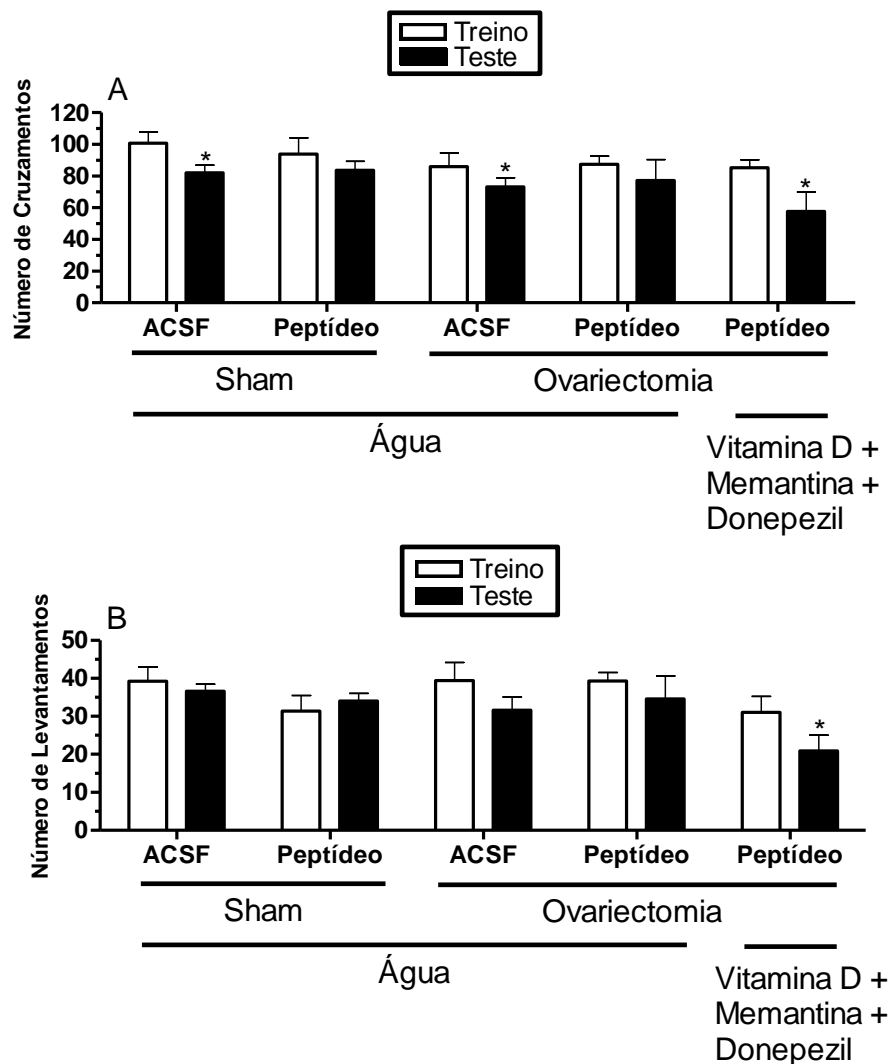
Os resultados apresentados na figura 6 mostram os dados do labirinto em Y. Teste *T* de *Student* mostrou diferença significativa somente no grupo Sham + ACSF + água [t(9): -2,78, p<0,05]. Isso indica que somente o grupo controle aprendeu a tarefa, mostrando nenhum prejuízo na memória espacial de curto prazo. Enquanto os grupos Sham + A $\beta$ 1-42 + água, OVX + ACSF + água, OVX + A $\beta$ 1-42 + água e OVX + A $\beta$ 1-42 + vitamina D + memantina + donepezil não mostraram diferenças significativas entre os braços outro e novo indicando que os animais não aprenderam a tarefa, ou seja, houve dano na memória espacial de curto prazo e o tratamento não foi capaz de revertê-lo.



**Figura 6.** Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg), no teste de labirinto em Y, em camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com A $\beta$ 1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura mostra o tempo de exploração em segundos em cada braço do labirinto. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 9-13 animais por grupo, \*p<0,05 quando comparado com o “outro” braço.

A figura 7 mostra os resultados do teste de habituação ao campo aberto. Na figura 7A estão os resultados do número de cruzamentos e na figura 7B os resultados do número de levantamentos. O teste *T* de *Student* mostrou diferenças significativas no número de cruzamentos para o grupo Sham + ACSF + água [t(10): 2,95, p<0,05], OVX + ACSF + água [t(9): 2,47, p<0,05] e OVX + A $\beta$ 1-42 + vitamina D + memantina + donepezil [t(7): 3,02, p<0,05]. No número de levantamentos, o teste *T* de *Student* mostrou diferença significativa somente para o grupo OVX + A $\beta$ 1-42 +

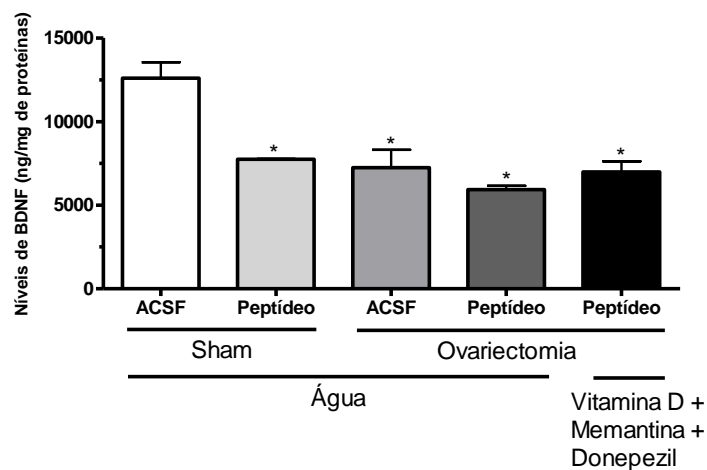
vitamina D + memantina + donepezil [t(7): 2,94,  $p < 0,05$ ]. Juntos, os resultados da figura 7A e da figura 7B mostram que os animais dos grupos Sham + ACSF + água e OVX + ACSF + água aprenderam no número de cruzamentos, mas não no número de levantamentos. Os grupos Sham + A $\beta$ 1-42 + água e OVX + A $\beta$ 1-42 + água não aprenderam no número de cruzamentos e nem mesmo no número de levantamentos, mostrando dano na memória de habituação ao campo aberto. Contudo, o tratamento com a tripla associação de vitamina D + memantina + donepezil reverteu completamente o dano da memória de habituação ao campo aberto, tanto no número de cruzamentos quanto no número de levantamentos, causado pelo peptídeo A $\beta$ 1-42 associado com a OVX. Isso indica que a tripla associação foi protetora contra o dano na memória de habituação ao campo aberto.



**Figura 7.** Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg), no teste da memória de habituação ao campo aberto, em camundongos fêmeas Balb/C

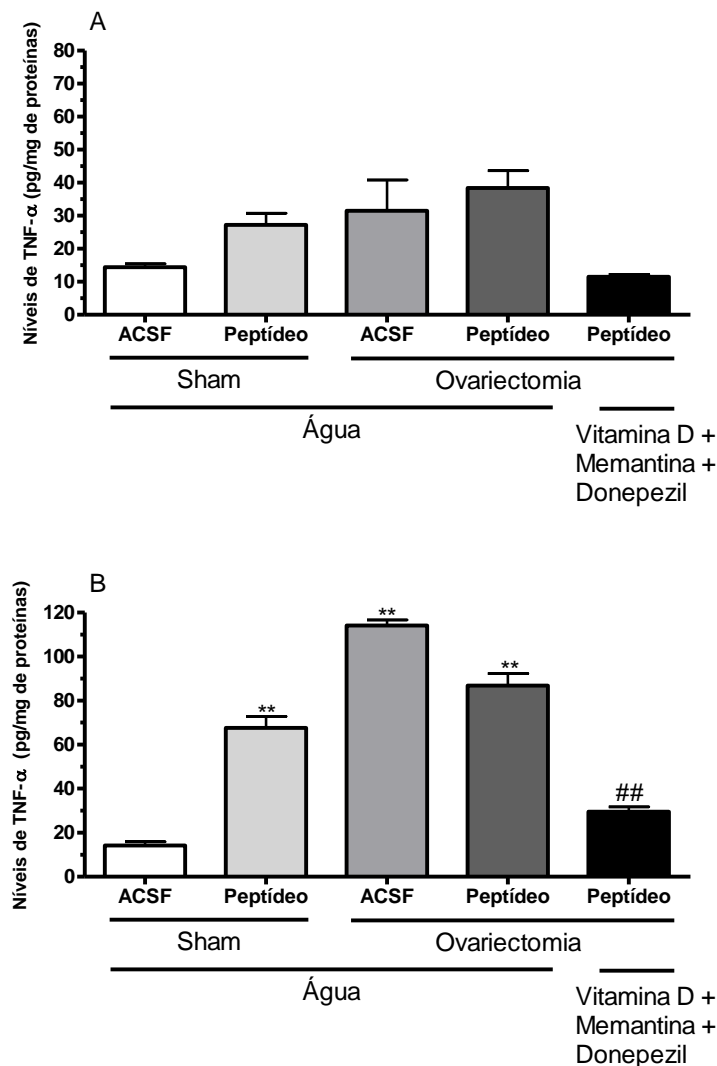
ovariectomizadas administradas com A $\beta$ <sub>1-42</sub> i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. A figura A mostra o número de cruzamentos e a figura B mostra o número de levantamentos dos animais no aparato de campo aberto. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 8-11 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado com o mesmo grupo na sessão treino.

A figura 8 mostra a dosagem de BDNF no hipocampo de animais Sham ou OVX. ANOVA de uma via mostrou diferença significativa [F(4,10)=4,57,  $p < 0,05$ ]. O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou redução significativa nos níveis de BDNF em todos os grupos experimentais quando comparado ao grupo controle e o tratamento com vitamina D + memantina + donepezil não foi capaz de reverter este efeito.



**Figura 8.** Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de BDNF no hipocampo de camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com A $\beta$ <sub>1-42</sub> i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 3 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Sham + ACSF + água.

Na figura 9 estão os resultados de dosagem de TNF $\alpha$  no córtex frontal (9A) e hipocampo (9B) de animais Sham e OVX. No córtex frontal a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas [F(4,16)=1,41,  $p = 0,27$ ]. Porém, no hipocampo ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas [F(4,14)=25,57,  $p < 0,01$ ] para os níveis de TNF $\alpha$ . O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou níveis aumentados de TNF $\alpha$  nos grupos Sham + A $\beta$ <sub>1-42</sub> + água, OVX + ACSF + água e OVX + A $\beta$ <sub>1-42</sub> + água. O tratamento com vitamina D + memantina + donepezil reverteu o aumento dos níveis desta citocina.

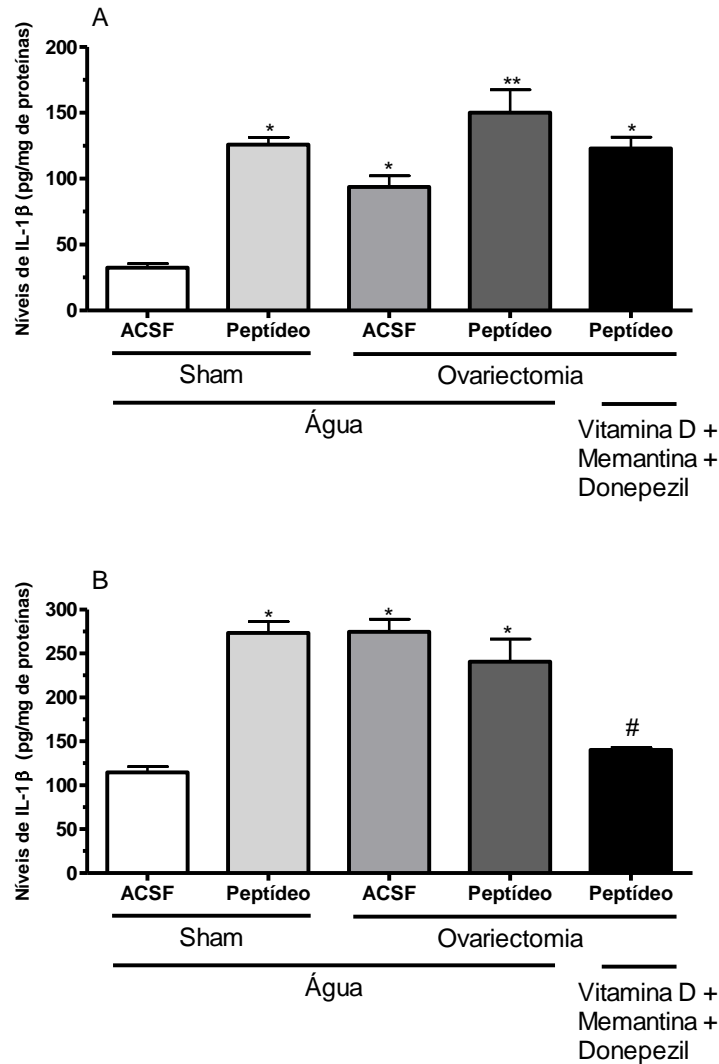


**Figura 9.** Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de TNF $\alpha$  no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com A $\beta$ <sub>1-42</sub> i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 3-5 animais por grupo. \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo Sham + ACSF + água. ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo OVX + A $\beta$ <sub>1-42</sub> + água.

A figura 10 mostra os resultados de dosagem de IL-1 $\beta$  no córtex frontal (10A) e hipocampo (10B). ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas [F(4,17)=5,88,  $p < 0,01$ ] para os níveis de IL-1 $\beta$  no córtex frontal. O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* indicou que todos os grupos experimentais apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle, Sham + ACSF + água. Isso indica que no córtex frontal, o peptídeo no grupo Sham, assim como a OVX e/ou peptídeo apresentaram níveis elevados de IL-1 $\beta$  e o tratamento com vitamina D + memantina + donepezil não reverteu este efeito. No hipocampo a ANOVA de uma via mostrou



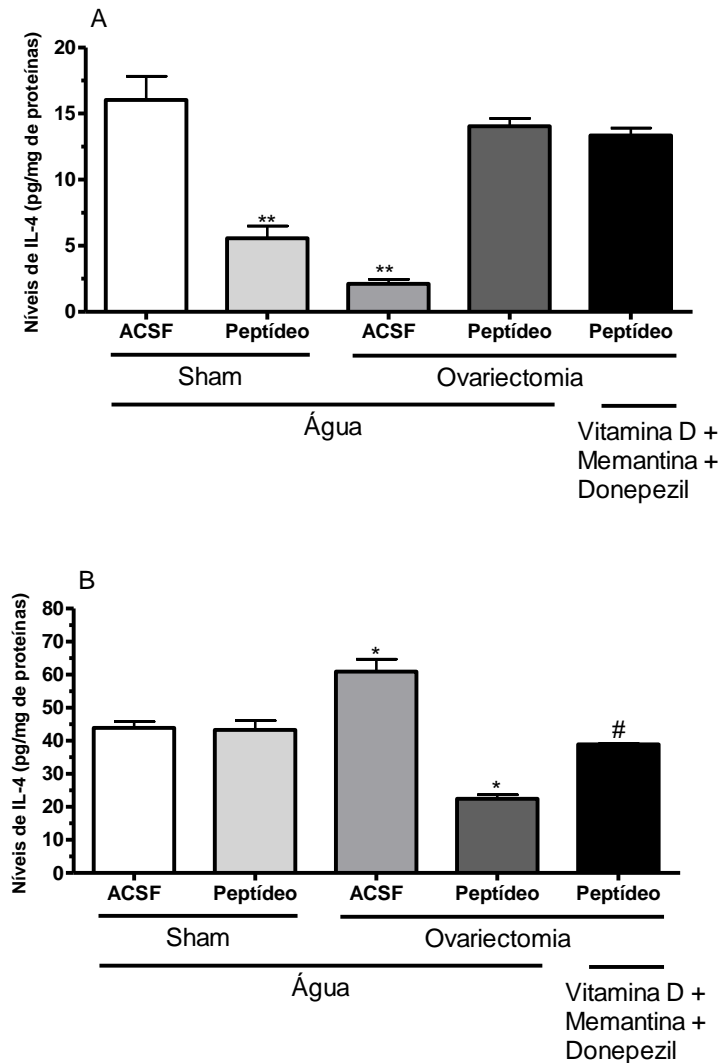
diferença significativa na dosagem de IL-1 $\beta$  [F(4,20)=5,31, p<0,01]. O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou níveis aumentados de IL-1 $\beta$  nos grupos Sham + A $\beta$ 1-42 + água, OVX + ACSF + água e OVX + A $\beta$ 1-42 + água. O tratamento com vitamina D + memantina + donepezil reverteu o aumento dos níveis desta citocina.



**Figura 10.** Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de IL-1 $\beta$  no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com A $\beta$ 1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo. \*\*p<0,01 \*p<0,05 quando comparado ao grupo Sham + ACSF + água. #p<0,05 quando comparado ao grupo OVX + A $\beta$ 1-42 + água.

A figura 11 mostra a dosagem de IL-4 no córtex frontal (11A) e hipocampo (11B) em animais Sham ou OVX. ANOVA de uma via mostrou diferença significativa [F(4,20)=6,67, p<0,01] para níveis de IL-4 no córtex frontal. O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou redução significativa para os níveis de IL-4 no grupo Sham

+ A $\beta$ 1-42 + água e OVX + ACSF + água no córtex frontal. No hipocampo, ANOVA de uma via mostrou diferença significativa [ $F(4,17)=7,57$ ,  $p<0,01$ ] para níveis de IL-4. O teste *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou aumento significativo nos níveis de IL-4 no grupo OVX + ACSF + água, redução dos níveis desta citocina no grupo OVX + A $\beta$ 1-42 + água. Este efeito foi revertido pelo tratamento com a vitamina D + memantina + donepezil.



**Figura 11.** Efeito do tratamento com vitamina D (420 UI/kg) + memantina (5 mg/kg) + donepezil (1 mg/kg) nos níveis de IL-4 no córtex frontal (A) e hipocampo (B) de camundongos fêmeas Balb/C ovariectomizadas administradas com A $\beta$ 1-42 i.c.v. para indução do modelo animal de demência do tipo DA. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 4-5 animais por grupo, \*\* $p<0,01$  e \* $p<0,05$  quando comparado ao grupo Sham + ACSF + água. # $p<0,05$  quando comparado ao grupo OVX + A $\beta$ 1-42 + água.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a cirurgia de remoção bilateral dos ovários (OVX) foi efetiva na redução dos níveis de E2 e, que o tratamento com suplementação de vitamina D3 420 UI/Kg por 17 dias foi capaz de aumentar os níveis séricos de vitamina D3 nos animais suplementados de forma significativa. Também foi possível observar que a ocorrência de níveis diminuídos de E2 em combinação com a administração de peptídeo A $\beta$ 1-42 foi capaz de induzir a danos de memória espacial de curto e longo prazo e de memória de habituação em campo aberto. Além disso, induziu a reduções dos níveis da neurotrofina BDNF e da citocina antiinflamatória IL-4 no hipocampo dos animais, bem como aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  no hipocampo e de IL-1 $\beta$  no hipocampo e no córtex frontal dos animais estudados. Em contrapartida, o tratamento de associação tripla com vitamina D3 + memantina + donepezil foi capaz de reverter os efeitos de dano a memória espacial de longo prazo e a memória de habituação em campo aberto, assim como reverter as alterações nos níveis de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-4 no hipocampo dos animais tratados.

Vale destacar que a OVX isoladamente também causou danos aos animais, gerando prejuízo na memória de curto prazo, diminuição dos níveis da neurotrofina BDNF no hipocampo e da citocina antiinflamatória IL-4 no córtex, além de aumento de citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  (no hipocampo) e IL-1 $\beta$  (no córtex e no hipocampo). A cirurgia de remoção dos ovários (OVX), é utilizada em estudos dos efeitos decorrentes do declínio da presença de E2 em modelos animais de menopausa (Rigalli e Loreto, 2009).

A senescência hormonal característica da menopausa é parte natural do processo de envelhecimento, e por vezes, esse decréscimo nos níveis de E2 resulta em alterações fisiológicas no cérebro (Koebele e Bimonte-Nelson, 2016), associando-se à déficits cognitivos e prejuízos de memória, além de maior neurodegeneração (Candeias et al, 2016; Siebert et al, 2017). Relata-se, também, que a menopausa induzida cirurgicamente (OVX) é relacionada com uma maior formação de placas de peptídeo A $\beta$ 1-42 (Bove et al, 2014; Candeias et al, 2016) e com uma redução acentuada da capacidade cognitiva (Bove et al, 2014; Nebel et al, 2018). Além disso, a idade precoce de início da menopausa (natural ou induzida)

pode estar associada a um risco aumentado de demências e declínio cognitivo (Nebel et al, 2018), fato que pode ser compreendido como uma relação entre um maior tempo de privação da ação do E2 e uma maior ocorrência de alterações intelectuais.

A escassez de E2, principalmente na região hipocampal resulta em perda de espinhas sinápticas e neurodegeneração (Nebel et al, 2018), além da conversão de um estado metabolicamente ativo e saudável para um estado de baixa atividade metabólica e oxidativo, com um desequilíbrio na capacidade de depuração amilóide (Zhao, Woody e Chhibber, 2015). Sugerindo, assim, que os efeitos outrora benéficos da presença do estrogênio, são sucedidos por uma maior predisposição a demências, como a DA (Bove et al. 2014; Pike, 2016). Esta relação é reforçada por estudos comparativos quanto aos níveis cerebrais de estrogênio em mulheres idosas com e sem DA, onde as mulheres diagnosticadas com DA apresentaram níveis reduzidos de 17 $\beta$ -estradiol (Yue et al, 2005; Rosario et al, 2011). Ao comparar estes resultados com a falta de diferenças significativas nos níveis cerebrais de estrogênios entre homens com e sem DA (Rosario et al, 2011), pode-se sugerir que a depleção estrogênica pode aumentar a vulnerabilidade à DA especificamente em mulheres (Pike, 2016).

Estes achados corroboram com o presente estudo onde os animais submetidos a OVX e, por consequência, com níveis mais baixos de E2 apresentaram prejuízo na memória de curto prazo, aumento de citocinas pró-inflamatórias, diminuição de neurotrofina e de citocina anti-inflamatória, previamente descritos. Além disto, quando a OVX foi associada a administração do peptídeo A $\beta$ 1-42, os animais apresentaram um proeminente aumento da citocina IL-1 $\beta$  no córtex (pró-inflamatória) (figura 10A) e uma potencialização dos danos de memória de longo prazo.

Os danos a memória, especialmente, são característicos do período pós-menopausa, visto que quase metade das mulheres relatam problemas de atenção, concentração e memória nesta fase (Woods, Mitchell e Adams, 2000), sendo que cerca de um terço destas caracterizam estes distúrbios como de gravidade moderada, tornando-se um possível indicativo de disfunção cognitiva (Vega et al, 2016). No presente estudo, a avaliação dos parâmetros comportamentais e da capacidade de aprendizagem dos animais demonstrou que a administração de

peptídeo A $\beta$ 1-42 foi capaz de induzir a danos de memória espacial de longo e curto prazo (labirinto radial e labirinto em Y, respectivamente) e memória de habituação em campo aberto. Tendo em vista que a diminuição da capacidade cognitiva e o declínio da memória espacial são sintomas clínicos da DA, danos de aprendizagem e de memória espacial já foram relatados em estudos com camundongos transgênicos (Morgan et al, 2000; Kiyota et al, 2010;) e em modelos de administração de oligômeros A $\beta$ 1-42 (Budni et al, 2017; Garcez et al, 2018), pois o acúmulo de peptídeo A $\beta$  é capaz de causar toxicidade às células neurais, causando um prejuízo característico da DA, induzindo a um declínio cognitivo tanto de memória espacial quanto de habituação (Budni et al, 2017; Garcez et al, 2017), contribuindo para a validade do modelo de demência em induzir danos semelhantes a patologia.

A utilização de labirintos compõe uma técnica clássica para estudos de memória em roedores e possibilita a avaliação de memórias de longo prazo (referência) e de curto prazo (trabalho), além de possibilitar a utilização de orientação espacial através de pistas, incentivando esta tendência costumeira dos roedores de se locomoverem utilizando sinais de referência. Ademais, a aplicação de labirintos no estudo da memória de roedores é sensível aos efeitos de alterações hormonais gonadais associadas ao envelhecimento, a redução folicular e a OVX (Koebele e Bimonte-Nelson, 2016).

Neste estudo, o labirinto radial foi utilizado para a avaliação da memória de longo prazo com orientação espacial e, para tanto, o animal deveria encontrar a recompensa alimentar em dias subsequentes, resultando em um volume de memória de trabalho cumulativo no decorrer dos testes, gerando em uma memória de referência. Essa avaliação é especialmente interessante nos estudos translacionais de menopausa, pois é considerada uma medida semelhante à tarefa de memória verbal, impraticável em modelos animais, mas que muitas vezes é afetada em mulheres neste período (Koebele e Bimonte-Nelson, 2016). Entretanto, os resultados decorrentes não demonstraram que a OVX isoladamente induziu a dano de memória espacial de longo prazo, pois os animais do grupo OVX + ACSF + água aprenderam a tarefa no terceiro dia de teste, da mesma forma que o grupo controle (Sham + ACSF + água). Porém, ao associar a OVX à administração do peptídeo A $\beta$ 1-42, o resultado foi indicativo de prejuízo de memória, pois os animais

não conseguiram aprender a tarefa, sendo que no grupo onde foi apenas induzida a demência (Sham + A $\beta$ 1-42 + água) sem a OVX, os animais haviam aprendido apenas no quinto dia do teste, o que já caracteriza um prejuízo à memória mas que, contudo, foi intensificado pela combinação com indução a menopausa. Em adição, o tratamento associado de vitamina D, memantina e donepezil foi capaz de reverter este dano.

Ainda, neste estudo foi avaliada a memória espacial de curto prazo através do labirinto em Y, uma vez que nos estágios iniciais da DA, os pacientes costumam apresentar desorientação e comprometimento da memória visuoespacial como consequência mais evidente de dano à memória (Tu et al, 2015; Foxe et al, 2016). Nesta avaliação, demonstrou-se que, tanto a OVX como a administração do peptídeo A $\beta$ 1-42, foram capazes de induzir ao dano de memória, de forma isolada e em combinação, pois grupo controle foi o único a apresentar diferença significativa entre as duas sessões, indicando que não obteve danos, diferentemente dos grupos submetidos a OVX (Cai et al, 2013; Hawley et al, 2014; Zingue et al, 2018) ou ao peptídeo A $\beta$ 1-42 (Budni et al., 2017; Garcez et al, 2018), nos quais já esperava-se que houvesse dano cognitivo de memória. Os dados de dano a memória de curto prazo assemelham-se aos resultados encontrados por Wolf e colaboradores (2016), onde camundongos transgênicos para modelo de DA foram submetidos ao teste de labirinto em Y e os grupos com demência induzida não demonstraram diferenças significativas de alternância entre os braços do aparato. Fato este que pode ser relacionado com a possibilidade de os camundongos não reconhecerem os braços previamente visitados, não diferenciando o braço novo dos demais (Wolf et al, 2016).

Estes resultados se identificam com os obtidos em um estudo com um modelo animal de indução a DA através de privação prolongada de hormônios ovarianos, induzida por OVX, combinada com administração de D-galactose (D-gal) em que os animais submetidos ao modelo de DA tiveram um tempo gasto no braço novo sem diferenças significativas em relação ao braço previamente visitado (Gok et al, 2016). Resultados semelhantes foram encontrados em modelos animais de OVX (Cai et al, 2013) e DA isoladamente (Garcez et al, 2018). Nestes estudos em que estuda-se OVX ou modelo de DA isoladamente, os tratamentos com ácido rosmarínico (Gok et al, 2016), tenuigenina (Cai et al, 2013) e minociclina (Garcez et

al, 2018) foram efetivos na reversão dos danos de memória de curto prazo avaliadas no labirinto em Y, diferindo dos resultados encontrados neste estudo, onde o tratamento associado de vitamina D, memantina e donepezil não conseguiu modificar este parâmetro.

Em contrapartida, na memória de habituação ao campo aberto, a tripla associação foi protetora contra o dano causado pela administração do peptídeo em combinação com a OVX, diferindo de estudos prévios onde a suplementação com vitamina D em ratas ovariectomizadas, e a própria OVX isoladamente, não alteraram estes parâmetros (Siebert et al, 2018). Esta avaliação através do teste em campo aberto analisa, através da habituação comportamental a um novo ambiente, as tarefas de aprendizagem não-associativas (Vianna et al, 2000). Os danos a memória de habituação ao campo aberto demonstrados nesse estudo assemelham-se aos dados de outras pesquisas onde tanto a OVX (Djiogue et al, 2018) quanto a DA (Orta-salazar, Feria-velasco e Díaz-cintra, 2017) causaram declínios de desempenho nas tarefas cognitivas motoras e no comportamento exploratório (Gok et al, 2016).

Em geral, as tarefas de memória associativa podem ser bastante úteis na percepção do comprometimento decorrente da DA, pois são dependentes da integridade do hipocampo, uma das principais regiões afetadas nesta patologia (Sperling et al, 2010), e que desempenha uma função crítica na orientação espacial e navegação (Lee et al, 2014). Tendo em vista que a memória de curto prazo relaciona-se mais a áreas do córtex pré-frontal, enquanto que a memória de longo prazo está mais ligada a região hipocampal (Lee et al, 2014; Djiogue et al, 2018), os resultados deste trabalho em relação aos testes comportamentais de memória podem ser justificados, ao menos parcialmente, pelo fato de que a vitamina D possui uma atuação mais notável no hipocampo (Brown et al, 2003; Dursun, Gezen-Ak e Yilmazer, 2011; Annweiler e Beauchet, 2012), uma vez que o tratamento associado de memantina + donepezil + vitamina D foi eficaz no teste do labirinto radial (memória de longo prazo), porém não teve efeitos benéficos no teste do labirinto em Y (memória de curto prazo).

O hipocampo é uma importante região do cérebro relacionada com as funções de memória e aprendizagem (Şahin et al, 2019), além de conscientização contextual e espacial (Barrientos et al, 2016; Deuker et al, 2016), sendo responsável por formar novas associações entre elementos de informações previamente não

relacionadas, contribuindo para a codificação episódica (Sperling et al, 2010; Knierim, 2015; Barrientos et al, 2016; Deuker et al, 2016). O complexo hipocampal é uma das primeiras regiões afetadas durante a patologia da DA tendo sua conectividade alterada e apresentando-se como um parâmetro importante na DA pré-clínica (Harrison et al, 2015). Já em relação a menopausa, destaca-se que o E2 tem notável atuação no hipocampo, posto que exerce seus efeitos cerebrais através de receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  localizados nas espinhas dendríticas, nos dendritos, axônios e núcleo dos neurônios do hipocampo (Djiogue et al, 2018). Sua relação com a vitamina D, por sua vez, destaca-se pelos efeitos benéficos que esta substância exerce nesta região, tais como: redução do estresse oxidativo nos neurônios hipocampais (Dursun, Gezen-Ak e Yilmazer, 2011; Annweiler e Beauchet 2012), reconstrução de redes neurais funcionais, aumento da síntese de agentes neurotróficos e aceleração do crescimento dos neurônios (Brown et al 2003), atenuação do acúmulo de peptídeo A $\beta$ 1-42 e reversão do quadro inflamatório local (Nissou et al 2014) e ajuste na expressão de citocinas inflamatórias (Landel et al, 2016). Sendo assim, um impacto no processo inflamatório relativo ao uso de vitamina D não deve ser considerado inesperado (Landel et al, 2016).

Neste estudo, foi observado que em relação a expressão de citocinas inflamatórias houve um aumento nos níveis de TNF $\alpha$  no hipocampo e de IL-1 $\beta$  no hipocampo e no córtex frontal dos animais submetidos a OVX e/ou administração de peptídeo A $\beta$ 1-42, o que reforça a tese de que tanto a privação de E2, quanto a DA apresentam um perfil predisponente a um ambiente inflamatório. Estudos prévios evidenciaram a relação entre os níveis de TNF $\alpha$  e a DA ao utilizarem estratégias anti-inflamatórias em camundongos transgênicos resultando em uma redução da patologia relacionada ao peptídeo A $\beta$ 1-42 e a proteína tau e restaurando os déficits de memória após regularem a síntese de TNF $\alpha$  (Gabbita et al, 2015) ou a atuação de seu receptor (Detrait et al, 2014).

Estes dados corroboram estudos prévios em que a administração de A $\beta$ 1-42 aumentou a secreção de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-10 (Mizwicki et al, 2013; Garcez et al, 2017). De antemão, consta que níveis significativamente elevados de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , em regiões cerebrais relacionadas com cognição, como o hipocampo, têm sido prejudiciais em relação a memória em ratos adultos jovens (Barrientos et al, 2016). Esta correlação



pode ser reforçada com a observação dos dados deste estudo em relação a dano a memória (figuras 5, 6 e 7) e de dosagem de citocinas pró-inflamatórias (figuras 9B e 10), onde os grupos de animais que apresentaram aumento de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  também demonstraram lesão na memória de curta e longa duração e de habituação em campo aberto.

A prevalência do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo neste estudo, pode ser corroborada pela análise feita por Barrientos e colaboradores (2016), onde concluiu-se que a resposta amplificada de citocinas foi específica no hipocampo de ratos envelhecidos, não sendo observada no hipotálamo, córtex parietal, córtex pré-frontal, baço ou soro. Este fato pode ser justificado pela alta expressão de receptores de IL-1 nos neurônios e glia nas células granulares do giro denteado e na camada de células piramidais do hipocampo e pela população microglial particularmente densa nesta região (Barrientos et al, 2016).

Todavia, o tratamento associado de vitamina D + memantina + donepezil foi capaz de reverter o aumento das citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de forma significativa (figuras 9B e 10B) nos animais submetidos a OVX associada à DA. Desta forma, reforçando a competência antiinflamatória da vitamina D, já reportada em estudos prévios onde os efeitos desta vitamina foram capazes de reduzir parâmetros inflamatórios no hipotálamo (Farhangi et al, 2017), e reverter os níveis de citocinas inflamatórias decorrentes do acúmulo de peptídeo A $\beta$ 1-42 (Mizwicki et al, 2013). Contudo, neste trabalho, não se pode afirmar que esse efeito foi exclusivamente devido a administração de vitamina D, já que não foi realizado um grupo administrado somente com vitamina D e um grupo administrado somente com memantina e donepezil.

As citocinas são consideradas importantes mediadoras no processo de neuroinflamação e, apesar de serem classificadas como pró e antiinflamatórias, o seu equilíbrio é que destaca-se como fundamental na resposta efetiva frente a injúrias no sistema nervoso central (Uchoa, Moser e Pike, 2016). Desta forma, a análise dos níveis de IL-4, uma citocina antiinflamatória, também foi realizada neste estudo. Assim, observou-se que a IL-4 teve seus níveis diminuídos nos grupos submetidos a DA ou OVX (isoladamente) no córtex frontal, e nos grupos expostos a OVX e a administração do peptídeo A $\beta$ 1-42 concomitantemente no hipocampo. Estudos prévios demonstraram resultados semelhantes através da redução dos

níveis de IL-4 após a privação estrogênica (Yasui et al, 2007; Ma et al, 2007) e na DA (Tai et al, 2015; Budni et al, 2017; Garcez et al, 2017)

Todavia, o tratamento triplo de associação com vitamina D foi capaz de restaurar os níveis desta citocina no hipocampo nos animais submetidos a OVX juntamente com DA, corroborando com a atividade antiinflamatória previamente destacada da vitamina (Annweiler, 2016). Entretanto, essa eficácia não pode ser totalmente atribuída a vitamina D, visto que não houve avaliação destes parâmetros em grupos com administração isolada de vitamina ou memantina e donepezil.

É necessário evidenciar que no hipocampo o grupo OVX (OVX + ACSF + água) surpreendentemente apresentou níveis elevados de IL-4. Resultados de um estudo realizado por Villa e colaboradores (2015) também demonstraram resultados inesperados na relação entre IL-4 e E2, onde aparentemente a atividade da IL-4 foi afetada negativamente pela presença de E2. Tais fatos ainda carecem de maiores estudos para sua compreensão de forma mais assertiva.

Ainda, neste estudo foram avaliados os níveis de BDNF no hipocampo dos animais, e demonstrou-se que tanto a OVX quanto a administração do peptídeo A $\beta$ 1-42 foram efetivos na redução dos níveis desta neurotrofina. Esses resultados apoiam a teoria de que a diminuição dos níveis de E2, assim como a DA, geram uma redução nos níveis de neurotrofinas, entre elas o BDNF. Resultados semelhantes foram encontrados ao evidenciar a correlação negativa significativa entre os níveis séricos de BDNF e a idade da menopausa (Czyzyk et al, 2017), assim como ao destacar que a expressão de BDNF no hipocampo pode ser alterada significativamente por variações nos níveis de E2 (Wu et al, 2015; Zhao, Woody e Chhibber, 2015). Da mesma forma, alterações na expressão de BDNF foram relacionadas a DA (Peng et al, 2005), levando a diminuição de seus níveis (Yasutake et al, 2006; Lee et al, 2009; Gezen-Ak et al, 2013). Porém o tratamento com associação tripla não foi capaz de reverter este efeito, diferindo de um estudo realizado por Sahin e colaboradores (2019), no qual a vitamina D foi capaz de aumentar os níveis de BDNF no hipocampo. Vale salientar que no estudo citado os animais foram submetidos a um protocolo experimental de epilepsia, não ocorrendo a administração de peptídeo A $\beta$ 1-42 e a privação estrogênica, fato de pode tornar o resultado encontrado nesse estudo dependente do modelo estudado, implicando em vias e mecanismos específicos que precisam ser posteriormente esclarecidos.

Contudo, o tratamento associado de vitamina D, memantina e donepezil demonstrou resultados positivos, em geral. Pois foi capaz de reverter os danos de memória espacial de longo prazo e de memória de habituação em campo aberto, além de reestabelecer os níveis de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias. Esse fato é consideravelmente importante, visto que atualmente não há cura para a DA e os tratamentos clássicos atuais, além de terem efeitos transitórios, são limitados em relação a melhorias de cognição (Annweiler, 2011; Mielke et al, 2012). Portanto, a associação dos medicamentos clássicos com uma substância previamente conhecida e aprovada, como a vitamina D, facilitaria a inserção de um tratamento combinado como parte de um regime de “múltiplas drogas” visando diferentes alvos, com capacidade de melhoria dos prejuízos já conhecidos causados pela DA.

Além disso, previamente, mostrou-se que os níveis do receptor VDR no cérebro na presença do peptídeo A $\beta$ 1-42 foram diminuídos, mesmo em pacientes com níveis suficientes de vitamina D, o que indica que a suplementação pode ser necessária mesmo em pacientes sem hipovitaminose buscando estimular e regular os mecanismos mediados pela vitamina D no cérebro, prejudicados pela fisiopatologia da DA (Dursun, Gezen-Ak e Yilmazer, 2011). Com isso, expõe-se a relevância de associar a vitamina D a fármacos clássicos presentes na terapêutica destes pacientes.

Por fim, existem evidências ligando o sexo feminino a uma resposta prejudicada no tratamento com fármacos clássicos para a DA, indicando um progresso mais lento de melhora clínica com o uso de inibidores da colinesterase em mulheres, especialmente naquelas com a presença do alelo ApoE4, diferentemente do sexo masculino, em que a progressão clínica foi mais rápida (Zhao, Woody e Chhibber, 2015), justificando assim, a necessidade de estudos contínuos em busca de soluções com atuação específica neste público-alvo. Portanto, de acordo com este estudo observa-se que a associação da vitamina D com memantina e donepezil pode ser uma importante estratégia terapêutica futura para a DA, principalmente em mulheres.

## 6. CONCLUSÃO

Apesar das diversas evidências relacionando a vitamina D e a diminuição do declínio cognitivo, poucos estudos investigaram os efeitos da suplementação desta vitamina em associação com fármacos clássicos como o donepezil e memantina em modelos animais de DA, e este estudo é o primeiro a avaliar esse tratamento em um modelo duplo, DA e OVX. Seus resultados demonstram primeiramente que o modelo de indução à OVX em associação com a administração de peptídeo A $\beta$ 1-42 foi efetivo na privação estrogênica, reduzindo os níveis de E2 e, posteriormente, na indução de dano de memória em camundongos fêmeas.

Em contrapartida, o tratamento com associação de vitamina D, memantina e donepezil foi capaz de aumentar os níveis séricos de vitamina D, reverter os danos de memória espacial de longo prazo e de memória de habituação em campo aberto, pelo menos em parte por reduzir níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , bem como aumentar níveis de IL-4 no hipocampo. Porém foi incapaz de reestabelecer os parâmetros de memória de curto prazo e de níveis de BDNF no hipocampo.

Essas descobertas fornecem uma nova perspectiva para estudos complementares visando compreender e modular o impacto da privação de estrogênio em complemento aos danos notáveis causados pela DA. De forma positiva, esta busca pode levar ao descobrimento de novas abordagens terapêuticas com resultados realmente efetivos na redução dos danos cognitivos e comportamentais decorrentes da demência, como a DA.

## REFERÊNCIAS

- Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Reduced 25-hydroxyvitamin D and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Alzheimers Dement*. 2014;10(3):296-302.
- Allegri RF, Butman J, Arizaga RL, Machnicki G, Serrano C, Taragano FE, Sarasola D, Lon L. Economic impact of dementia in developing countries: an evaluation of costs of Alzheimer-type dementia in Argentina. *Int psychogeriatr*. 2006;19(4):705-18
- Alzheimer's Association. 2017 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* 2017;13:325-73.
- Annweiler C, Beauchet O. Possibility of a New Anti-Alzheimer's Disease Pharmaceutical Composition Combining Memantine and Vitamin D. *Drugs Aging*. 2012a;29(2):81-91.
- Annweiler C, Dursun E, Féron F, Gezen-Ak D, Kalueff AV, Littlejohns T, Llewellyn DJ, Millet P, Scott T, Tucker KL, Yilmazer S, Beauchet O. Vitamin D and cognition in older adults': updated international recommendations. *J Intern Med*. 2014;277(1): 45-57.
- Annweiler C, Fantino B, Parot-Schinkel E, Thiery S, Gautier J, Beauchet O. Alzheimer's disease - input of vitamin D with memantine assay (AD-IDEA trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2011;12:1-10.
- Annweiler C, Herrmann FR, Fantino B, Brugg B, Beauchet O. Effectiveness of the Combination of Memantine Plus Vitamin D on Cognition in Patients With Alzheimer Disease. *Cogn Behav Neurol*. 2012b;25(3):121-127
- Annweiler C. Vitamin D in dementia prevention. *Ann N York Acad Sci*. 2016;1367(1) 57-63.
- Araki T, Wake R, Miyaoka T, Kawakami K, Nagahama M, Furuya M, Limoa E, Liaury K, Hashioka S, Murotani K, Horiguchi J. The effects of combine treatment of memantine and donepezil on Alzheimer's Disease patients and its relationship with cerebral blood flow in the prefrontal area. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2014;29(9):881-889.
- Babaei P, Shirkouhi SG, Hosseini R, Tehrani BS. Vitamin D is associated with metabotropic but not neurotrophic effects of exercise in ovariectomized rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9(1):1-9.
- Bak J, Pyeon HI, Seok JI, Choi YS. Effect of rotation preference on spontaneous alternation behavior on Y maze and introduction of a new analytical method, entropy of spontaneous alternation. *Behav Brain Res*. 2017;320:219-224.
- Balin BJ, Hudson AP. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(3):1-10.
- Barral D. Vitamina D: uma abordagem molecular. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr*. 2007;7(3):309-15.
- Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience*. 2016;1-31.

Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982;217(4558):408-414.

Benussi L, Binetti G, Ghidoni R. Loss of neuroprotective factors in neurodegenerative dementias: the end or the starting point? *Front Neurosci*. 2017;11:1-8.

Bermejo-Pareja F, Llamas-Velasco S, Villarejo-Galende A. Prevención de la enfermedad de Alzheimer: un camino a seguir. *Rev Clín Esp*. 2016;216(9):495-503.

Blair JA, McGee H, Bhatta S, Palm R, Casadesus G. Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Involvement in Learning and Memory and Alzheimer's Disease: More than "just" Estrogen. *Front Endocrinol*. 2015;6:1-8.

Bloom GS. Amyloid- $\beta$  and tau. *Jama Neurol*. 2014;71(4):505-8.

Boinpally R, Laishun C, Zukin SR, McClure N, Hofbauer RK, Periclou A. A Novel Once-Daily Fixed-Dose Combination of Memantine Extended Release and Donepezil for the Treatment of Moderate to Severe Alzheimer's Disease: Two Phase I Studies in Healthy Volunteers. *Clin Drug Investig*. 2015;35(7):427-435.

Bove R, Secor E, Chibnik LB, Barnes LL, Schneider JA, Bennett DA, De Jager PL. Age at surgical menopause influences cognitive decline and Alzheimer pathology in older women. *Neurology*. 2014;82(3):222-29.

Briones TL e Darwish H. Vitamin D mitigates age-related cognitive decline through the modulation of pro-inflammatory state and decrease in amyloid burden. *J Neuroinflammation*. 2012;9:1-13.

Brown J, Bianco JI, McGrath JJ, Eyles DW. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett*. 2003;343(2):139-43.

Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis*. 2015;6(5):331-341.

Budni J, Feijó DP, Batista-Silva H, Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Krasilchik LR, Luz AP, Schiavo GL, Quevedo J. Lithium and memantine improve spatial memory impairment and neuroinflammation induced by  $\beta$ -amyloid 1-42 oligomers in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;141:84-92.

Cabezas R, Baez-Jurado E, Hidalgo-Lanussa O, Echeverria V, Ashrad G, Sahebkar A, Barreto GE. Growth Factors and Neuroglobin in Astrocyte Protection Against Neurodegeneration and Oxidative Stress. *Mol Neurobiol*. 2018:1-13.

Cai Z, Hussain MD, Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*. 2013;124(5):307-21.

Cai ZL, Wang CY, Gu XY, Wang NJ, Wang JJ, Liu WX, Xiao P, Li CH. Tenuigenin ameliorates learning and memory impairments induced by ovariectomy. *Physiol Behav*. 2013;118:112-117.

Candeias E, Duarte AI, Sebastião I, Fernandes MA, Plácido AI, Carvalho C, Correia S, Santos RX, Seíça R, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Middle-Aged Diabetic Females and Males Present Distinct Susceptibility to Alzheimer Disease-like Pathology. *Mol Neurobiol*. 2016;54(8):6471-6489.

Chen J, Wang T, An C, Jiang C, Zhao J, Li S. Brain-derived neurotrophic factor: a mediator of inflammation-associated neurogenesis in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2016;27(8):1-19.

Cheng J, Xia X, Rui Y, Zhang Z, Qin L, Han S, Wan Z. The combination of 1 $\alpha$ ,25dihydroxyvitaminD3 with resveratrol improves neuronal degeneration by regulating endoplasmic reticulum stress, insulin signaling and inhibiting tau hyperphosphorylation in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol*. 2016;93:32-40.

Cheng Y, Feng Z, Zhang QZ, Zhang JT. Beneficial effects of melatonin in experimental models of Alzheimer disease<sup>1</sup>. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(2):129-139.

Chitnis T, Weiner HL. CNS inflammation and neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2017;127(10):3577-3587.

Congdon EE. Sex Differences in Autophagy Contribute to Female Vulnerability in Alzheimer's Disease *Front Neurosci*. 2018;12:1-16.

Craig MC, Murphy DG. Estrogen therapy and Alzheimer's dementia. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1205:245-53.

Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JL. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimers Res Ther*. 2017;9(1):1-9.

Cubeddu A, Giannini A, Bucci F, Merlini S, Casarosa E, Pluchino N, Luisi S, Luisi M, Genazzani AR. Paroxetine increases brain-derived neurotrophic factor in postmenopausal women. *Menopause*. 2010;17(2): 338-343.

Czyzyk A, Filipowicz D, Podfigurna A, Ptas P, Piestrzynska M, Smolarczyk R, Genazzani AR, Meczekalski B. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plasma concentration in patients diagnosed with premature ovarian insufficiency (POI). *Gynecol Endocrinol*. 2017;33(5):413-417.

Davey DA. Alzheimer's disease, cerebrovascular disease and dementia: pathology, risk factors and prevention; a potentially preventable and modifiable syndrome. *J. Alzheimer Dis. Parkinsonism*. 2015;7:97-103.

Davey DA. Prevention of Alzheimer's disease, cerebrovascular disease and dementia in women: the case for menopause hormone therapy. *Neurodegenerative Disease Management*. 2017;7(1):85-94.

Dellu F, Fauchey V, Le Moal M, Simon H. Extension of a New Two-Trial Memory Task in the Rat: Influence of Environmental Context on Recognition Processes. *Neurobiol Learn Mem*. 1997;67(2):112-120.

Depypere H, Vierin A, Weyers S, Sieben A. Alzheimer's disease, apolipoprotein E and hormone replacement therapy. *Maturitas*. 2016;94:98-105.

Detrait ER, Danis B, Lamberty Y, Foerch P. Peripheral administration of an anti-TNF- $\alpha$  receptor fusion protein counteracts the amyloid induced elevation of hippocampal TNF- $\alpha$  levels and memory deficits in mice. *Neurochem Int*. 2014; 72:10-13.

Deuker L, Bellmund JLS, Schroder TN, Doeller CF. An event map of memory space in the hippocampus. *Elife*. 2016;5:1-26.

Diniz BS, Teixeira AL. Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: physiopathology and beyond. *Neuromolecular Med.* 2011;13(4):217-22.

Djiogue S, Djeuda ABD, Etet PFS, Wanda GJMK, Tadah RND, Njamen D. Memory and exploratory behavior impairment in ovariectomized Wistar rats. *Behav Brain Funct.* 2018;14(1):1-8.

Dumas JA, Kutz AM, McDonald BC, Naylor MR, Pfaff AC, Saykin AJ, Newhouse PA. Increased working memory-related brain activity in middle-aged women with cognitive complaints. *Neurobiol Aging.* 2013;34(4):1145-1147.

Durk MR, Han K, Chow ECY, Ahrens R, Henderson JT, Fraser PE, Pang KS.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> reduces cerebral amyloid accumulation and improves cognition in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2014;34(21):7091-101.

Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S. A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid- $\beta$  and preventing the amyloid- $\beta$  induced alterations by vitamin D in cortical neurons. *J Alzheimers Dis.* 2011;23(2):207-19.

Farhangi MA, Mesgari-Abbasi M, Nameni G, Hajiluian G, Shahabi P. The effects of vitamin D administration on brain inflammatory markers in high fat diet induced obese rats. *Bmc Neuroscience.* 2017;18(1):1-8.

Fatemi I, Heydari S, Kaeidi A, Shamsizadeh A, Hakimizadeh E, Khaluoi A, Allahtavakoli M. Metformin ameliorates the age-related changes of d-galactose administration in ovariectomized mice. *Fundam Clin Pharmacol.* 2018;32(4):392-399.

Ferreira ST, Clarke JR, Bomfim TR, De Felice FG. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014;10(1):76-83.

Foxe D, Leyton CE, Hodges JR, Burrell JR, Irish M, Piguet O. The neural correlates of auditory and visuospatial span in logopenic progressive aphasia and Alzheimer's disease. *Cortex.* 2016;83:39-50.

Foyet HS, Hritcu L, Ciobica A, Stefan M, Kamtchouing P, Cojocaru D. Methanolic extract of *Hibiscus asper* leaves improves spatial memory deficits in the 6-hydroxydopamine-lesion rodent model of Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol.* 2011;133(2):773-779.

Gabbita SP, Johnson MF, Kobritz N, Eslami P, Poteshkina A, Varadarajan S, Turman J, Zemlan F, Harris-White ME. Oral TNF $\alpha$  Modulation Alters Neutrophil Infiltration, Improves Cognition and Diminishes Tau and Amyloid Pathology in the 3xTgAD Mouse Model. *PLoS ONE.* 2015; 10:1-28.

Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Carneiro FG, Luz AP, Schiavo GL, Andrighetti MS, Scheid MG, Bolfe RR, Budni J. Minocycline reduces inflammatory parameters in the brain structures and serum and reverses memory impairment caused by the administration of amyloid  $\beta$  (1-42) in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017;77:23-31.

Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Luz AP, Schiavo GL, Macieski JMC, Medeiros EB, Marques AO, Magnus NQ, Budni J. The Involvement of NLRP3 on the Effects of Minocycline in an AD-Like Pathology Induced by  $\beta$ -Amyloid Oligomers Administered to Mice. *Mol Neurobiol.* 2018:1-12.



Gareri P, Putignano D, Castagna A, Cotroneo AM, Palo G, Fabbo A, Forgione L, Giacummo A, Lacava R, Marino S, Simone M, Zurlo A, Putignano S. Retrospective Study on the Benefits of Combined Memantine and cholinEsterase inhibitor treatMent in AGEd Patients affected with Alzheimer's Disease: The MEMAGE Study. *J Alzheimers Dis.* 2014;41(2):633-640.

Gezen-Ak D, Dursun E, Hanagasi H, Bilgic B, Lohman E, Araz OS. BDNF, TNFalpha, HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis.* 2013;37(1):185-95.

Gok DK, Ozturk N, Er H, Aslan M, Demir N, Derin N, Agar A, Yargicoglu P. Effects of rosmarinic acid on cognitive and biochemical alterations in ovariectomized rats treated with D-galactose. *Folia Histochem Cytobiol.* 2016;53(4):283-293.

Gomes GM, Dalmolin GD, Cordeiro MN, Gomez MV, Ferreira J, Rubin MA. The selective A-type K<sup>+</sup> current blocker Tx3-1 isolated from the Phoneutria nigriventer venom enhances memory of naïve and A $\beta$ 25-35-treated mice. *Toxicon.* 2013;76:23-7.

Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP. Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu Rev Med.* 2017;68(1):413-430.

Greig SL. Memantine ER/Donepezil: A Review in Alzheimer's Disease. *Cns Drugs.* 2015;29(11):963-970.

Hajiluian G, Nameni G, Shahabi P, Mesgari-Abbasi M, Sadigh-Eteghad S, Farhangi MA. Vitamin D administration, cognitive function, BBB permeability and neuroinflammatory factors in high-fat diet-induced obese rats. *Int J Obes.* 2017;41(4):639-644.

Hamdan AC, Ramos AA. Avaliação neuropsicológica na doença Alzheimer e demência frontotemporal: critérios nosológicos. *Interação Psicol.* 2016;18(3):391-7.

Hansberg-Pastor V, González-Arenas A, Piña-Medina AG, Camacho-Arroyo I. Sex hormones regulate cytoskeletal proteins involved in brain plasticity. *Front Psychiatry.* 2015;6:1-12.

Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12:383-388.

Harrison TM, Burggren AC, Small GW, Bookheimer SY. Altered memory-related functional connectivity of the anterior and posterior hippocampus in older adults at increased genetic risk for Alzheimer's disease. *Hum Brain Mapp.* 2015;37:366-380.

Hawley RH, Grissom EM, Moody NM, Dohanich GP, Vasudevan N. Activation of G-protein-coupled receptor 30 is sufficient to enhance spatial recognition memory in ovariectomized rats. 2014;262:68-73.

Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(6):358-72.

Hernando-Requejo V. Nutrición y deterioro cognitivo. *Nutr Hosp.* 2016;33(4):49-52.

Hogervost E, Yaffe K, Richards M, Huppert FA. Hormone replacement therapy to maintain cognitive function in women with dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;1:1-58.

Hritcu L, Cioanca O, Hancianu M. Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats. *Phytomedicine.* 2012;19(6):529-534.

Hu W, Feng Z, Xu J, Jiang Z, Feng M. Brain-derived neurotrophic factor modified human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived cholinergic-like neurons improve spatial learning and memory ability in Alzheimer's disease rats. *Brain Res.* 2019;1710:61-73.

Hung SY, Fu WM. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):1-12.

Imtiaz B, Tuppurainen M, Tiihonen M, Kivipelto M, Soininen H, Hartikainen S, Tolppanen AM. Oophorectomy, hysterectomy, and risk of Alzheimer's disease: a nationwide case-control study. *J. Alzheimers Dis.* 2014; 42(2):575-81.

Jevtic S, Sengar AS, Salter MW, McLaurin J. The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment. *Ageing Res Rev.* 2017;40:84-94.

Kantarci K, Lowe VJ, Lesnick TG, Tosakulwong N, Bailey KR, Fields JA, Shuster LT, Zuk SM, Senjem ML, Mielke MM, Gleason C, Jack CR, Rocca WA, Miller VM. Early postmenopausal transdermal 17 $\beta$ -estradiol and amyloid- $\beta$  deposition. *J Alzheimers Dis.* 2016;53:547-56.

Kim SH, Kandiah N, Hsu JL, Suthisisang C, Udommongkol C, Dash A. Beyond symptomatic effects: potential of donepezil as a neuroprotective agent and disease modifier in Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol.* 2017;174(23):4224-4232.

Kiyota T, Okuyama S, Swan RS, Jacobsen MT, Gendelman HE, Ikezu T. CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *Faseb J.* 2010;24(8):3093-3102.

Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol.* 2015;25:R1116-R1121.

Koebele SV, Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas.* 2016;87:5-17.

Krstic D, Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2012;9(1):25-34.

Kurt AK, Drake MT, Hurley DL. Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(8):752-8.

Lan, Yu-long; Zhao, Jie; LI, Shao. Update on the Neuroprotective Effect of Estrogen Receptor Alpha Against Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2014;43(4):1137-1148.

Landel V, Millet P, Baranger K, Loriod B, Féron F. Vitamin D interacts with *Esr1* and *Igf1* to regulate molecular pathways relevant to Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2016;11(1):1-22.

Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM. Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience*. 2015;302:103-111.

Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods*. 1986;16(4):355-7.

Lee JG, Shin BS, You YS, Kim JE, Yoon SW, Jeon DW. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in elderly Korean with dementia. *Psychiatry Investig*. 2009;6(4):299-305.

Lee JY, Sooyeon K, Yoo HB, Park S, Choi JS, Kwon JS, Cha KR, Jung HY. Spatial memory impairments in amnesic mild cognitive impairment in a virtual radial arm maze. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014;653-660.

Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(2):106-18.

Lobo RA, Davis SR, De Villiers TJ, Gompel A, Henderson VW, Hodis HN, Lumsden MA, Mack WJ, Shapiro S, Baber RJ. Prevention of diseases after menopause. *Climacteric*. 2014;17(5):540-56.

Ma LJ, Guzman EA, DeGuzman A, Muller AK, Walker AM, Owen LB. Local cytokine levels associated with delayed-type hypersensitivity responses: modulation by gender, ovariectomy, and estrogen replacement. *J Endocrinol*. 2007;193(2):291-297.

Matsuzono K, Hishikawa N, Ohta Y, Yamashita T, Deguchi K, Nakano Y, Abe K. Combination Therapy of Cholinesterase Inhibitor (Donepezil or Galantamine) plus Memantine in the Okayama Memantine Study. *J Alzheimers Dis*. 2015;45(3):771-780.

Mielke MM, Leoutsakos JM, Corcoran CD, Green RC, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Tschanz JT, Lyketsos CG. Effects of Food and Drug Administration-approved medications for Alzheimer's disease on clinical progression. *Alzheimers Dement*. 2012; 8:180-187.

Minter MR, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2015;136(3):457-474.

Mizwicki MT, Liu G, Fiala M, Magpantay L, Sayre J, Siani A, Mahanian M, Weitzman R, Hayden E, Rosenthal MJ, Nemere I, Ringman J, Teplow DB.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Resolvin D<sub>1</sub> Retune the Balance between Amyloid- $\beta$  Phagocytosis and Inflammation in Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis*. 2013;34(1):155-170.

Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen J, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. A $\beta$  peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000;408(6815):982-985.

Morley JE. Does vitamin D modulate cognition? *Nat Rev Neurol*. 2014;10(11):613-14.

Mpandzou G, Ait Ben Haddou E, Regragui W, Benomar A, Yahyaoui M. Vitamin D deficiency and its role in neurological conditions: a review. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(2):109-22.

Nebel RA, Aggarwal NT, Barnes LL, Gallagher A, Goldstein JM, Kantarci K, Mallampalli MP, Mormino MC, Scott L, Yu WH, Maki PM, Mielke MM. Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimers Demen.* 2018;14(9):1171-1183.

Nissou, M.F., A. Guttin, C. Zenga, et al. 2014. Additional clues for a protective role of vitamin D in neurodegenerative diseases: 1,25-dihydroxyvitamin D3 triggers an anti-inflammatory response in brain pericyte. *J. Alzheimers Dis.* 42: 789–799.

Orta-Salazar E, Feria-Velasco AI, Díaz-Cintra S. Alteraciones en la corteza motora primaria en la enfermedad de Alzheimer: estudio en el modelo 3xTg-AD. *Neurología*, 2017:1-8

Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2005;93(6):1412-21.

Pike CJ. Sex and the development of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2016;95(1-2):671-680.

Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2011;7:137–62.

Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol.* 2014;88(4):640-51.

Rentz DM, Weiss BK, Jacobs EG, Cherkerzian S, Klibanski A, Remington A, Aizley H, Goldstein JM. Sex differences in episodic memory in early midlife. *Menopause.* 2017;24(4):400-408.

Resende R, Ferreiro E, Pereira C, Oliveira CR. Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: Involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience.* 2008;155(3):725-737.

Rigalli A, Loreto VE. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat.* Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2009.

Rocca WA, Grossardt BR, Shuster LT. Oophorectomy, estrogen, and dementia: a 2014 update. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;389:7–12.

Rosario ER, Chang L, Head EH, Stanczyk FZ, Pike CJ. Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2011;32(4):604–613.

Ruiz-Muñoz AM, Nieto-Escamez FA, Aznar S, Colomina MT, Sanchez-Santed F. Cognitive and histological disturbances after chlorpyrifos exposure and chronic A $\beta$ (1–42) infusions in Wistar rats. *Neurotoxicology.* 2011;32(6):836-844.

Şahin S, Gürgeç SG, Yazar U, İnce I, Kamaşak T, Arslan EA, Durgut BD, Dilber B, Cansu A. Vitamin D protects against hippocampal apoptosis related with seizures induced by kainic acid and pentylenetetrazol in rats. *Epilepsy Res.* 2019;149:107-116.

Schroeder A, Hudson M, Du X, Wen Y, Wu C, Nakamura J, Buuse M, Jones NC, Hill RA. Estradiol and raloxifene modulate hippocampal gamma

oscillations during a spatial memory task. *Psychoneuroendocrinology*. 2017;78:85-92.

Shen L, Ji HF. Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: evidence from meta-analysis. *Nutr J*. 2015;14(1):1-5.

Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women. *Jama*. 2003;289(20):2651-62.

Siebert C, Pierozan P, Kolling J, Santos TM, Sebotaio MC, Marques EP, Biasibetti H, Longoni A, Ferreira F, Pessoa-Pureur R, Netto CA, Wyse ATS. Vitamin D3 reverses the hippocampal cytoskeleton imbalance but not memory deficits caused by ovariectomy in adult wistar rats. *Neuromolecular Med*. 2017;19(2-3):345-56.

Singh M, Kaur M, Chadha N, Silakari O. Hybrids: a new paradigm to treat Alzheimer's disease. *Mol Divers*. 2015;20(1):271-297.

Smith CC, Vedder LC, Nelson AR, Bredemann TM, Mc Mahon LL. Duration of estrogen deprivation, not chronological age, prevents estrogen's ability to enhance hippocampal synaptic physiology. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107:19543-48.

Sochocka M, Zwolińska K, Leszek J. The Infectious Etiology of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(7):996-1009.

Sperling RA, Dickerson BC, Pihlajamaki M, Vannini P, LaViolette PS, Vitolo OV, Hedden T, Becker JA, Rentz DM, Selkoe DJ, Johnson KA. Functional Alterations in Memory Networks in Early Alzheimer's Disease. *Neuromolecular Med*. 2010;12(1):27-43.

Tai LM, Ghura S, Koster KP, Liakaite V, Maienschein-Cline M, Kanabar P, Collins N, Ben-Aissa M, Lei AZ, Bahroos N, Green SJ, Hendrickson B, Van Eldik LJ, LaDu MJ. APOE-modulated A $\beta$ -induced neuroinflammation in Alzheimer's disease: current landscape, novel data, and future perspective. *J Neurochem*. 2015;133:465-488.

Takahashi TA, Johnson KM. Menopause. *Med Clin North America*. 2015;99(3):521-34.

Tan CC, Yu JT, Wang HF, Tan MS, Meng XF, Wang C, Jiang T, Zhu XC, Tan L. Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, and Memantine for the Treatment of Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(2):615-631.

Tanila H. Testing cognitive functions in rodent disease models: Present pitfalls and future perspectives. *Behav Brain Res*. 2018;352:23-27.

Tanila H. The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2017;97:114-118.

Tu S, Wong S, Hodges JR, Irish M, Piguet O, Hornberger M. Lost in spatial translation—a novel tool to objectively assess spatial disorientation in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Cortex*. 2015;67:83-94.

Uchoa MF, Moser A e Pike CJ. Interactions between inflammation, sex steroids, and Alzheimer's disease risk factors. *Front Neuroendocrinol.* 2016;43:60-82.

Ueda, K, Fukui Y, Kageyama H. Amyloid  $\beta$  protein-induced neuronal cell death: neurotoxic properties of aggregated amyloid  $\beta$  protein. *Brain Res.* 1994;639(2):240-244.

Vega JN, Zurkovsky L, Albert K, Melo A, Boyd B, Dumas J, Woodward N, McDonald BC, Saykin AJ, Park JH, Naylor M, Newhouse PA. Altered Brain Connectivity in Early Postmenopausal Women with Subjective Cognitive Impairment. *Front Neurosci.* 2016;10:1-11.

Vest RS, Pike CJ. Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. *Horm Behav.* 2013;63(2):301-7.

Vianna MRM, Alonso M, Viola H, Quevedo J, Paris F, Furman M, Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. *Learn Mem.* 2000;7(5):333-340.

Villa A, Rizzi N, Vegeto E, Ciana P, Maggi A. Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. *Sci Rep.* 2015;5(1):1-14.

Wolf A, Bauer B, Abner EL, Ashkenazy-Frolinger T, Hartz AMS. A Comprehensive Behavioral Test Battery to Assess Learning and Memory in 129S6/Tg2576 Mice. *Plos One.* 2016;11(1):1-23.

Woods NF, Mitchell ES, Adams C. Memory Functioning Among Midlife Women. *Menopause.* 2000;7(4):257-265.

Wu YWC, Du X, Buuse M, Hill RA. Analyzing the influence of BDNF heterozygosity on spatial memory response to 17 $\beta$ -estradiol. *Transl Psychiatry.* 2015;5(1):498-498.

Yamini P, Ray RS e Chopra K. Vitamin D3 attenuates cognitive deficits and neuroinflammatory responses in ICV-STZ induced sporadic Alzheimer's disease. *Inflammopharmacol.* 2017;26(1):39-55.

Yasui T, Maegawa M, Tomita J, Miyatani Y, Yamada M, Uemura H, Matsuzaki T, Kuwahara A, Kamada M, Tsuchiya N, Yuzurihara M, Takeda S, Irahara M. Changes in serum cytokine concentrations during the menopausal transition. *Maturitas.* 2007;56(4):396-403.

Yasutake C, Kuroda K, Yanagawa T, Okamura T, Yoneda H. Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2006;256(7):402-6.

Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufenbiel M, Harada N, Zhong Z, Shen Y, Li R. Brain estrogen deficiency accelerates A beta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(52):19198-19203.

Zemek F, Drtinova L, Nepovimova E, Sepsova V, Korabecny J, Klimes J, Kuca K. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opin Drug Saf.* 2014;6(13):759-774.

Zhao H, Alam A, San CY, Eguchi S, Chen Q, Lian Q, Ma D. Molecular mechanisms of brain-derived neurotrophic factor in neuro-protection: Recent developments. *Brain Res.* 2017;1665:1-21.

Zhao L, Woody SK, Chhibber A. Estrogen receptor  $\beta$  in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutics. *Ageing Res Rev.* 2015;24:178-190.

Zingue S, Foyet HS, Djiogue S, Ezo'o YE, Abaïssou HHN, Fachagbo P, Njamen D. Effects of *Ficus umbellata* (Moraceae) Aqueous Extract and 7-Methoxycoumarin on Scopolamine-Induced Spatial Memory Impairment in Ovariectomized Wistar Rats. 2018;2018:1-14.

## ANEXO




## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 26/02/2019.

Título do projeto	Avaliação do efeito da vitamina D3 associada a memantina e donepezil em camundongos fêmeas submetidas à ovariectomia e ao modelo animal de demência induzido pelo peptídeo $\beta$ -amiloide 1-42
Project title	Evaluation of the effect of vitamin D3 associated with memantine and donepezil in female mice subjected to ovariectomy and an animal model of dementia induced by amyloid $\beta$ 1-42.
Número do protocolo Protocol number	063/2018-2 versão 2
Pesquisador principal Principal Investigator	Josiane Budni
Pesquisadores Researchers	Ana Daniela Coutinho Vieira, Tatiani Bellettini dos Santos, Débora Borges Tomaz, Gabriel Casagrande Zabot, Natália Baltazar do Nascimento, Nathália de Souza Pereira, Gustavo Luis Schiavo.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/03/2019 a 14/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico / Balb C
No de animais	240
Idade/Peso	90 dias / 30-35 g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

  
Samira da Silva Valvassori  
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 26 de Fevereiro de 2019.