

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

ALLISON JOSÉ PIRES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA
DE NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE PARÂMETROS
MOLECULARES E BIOQUÍMICOS EM MODELO DE
DEMÊNCIA EM RATOS**

**CRICIÚMA
2015**

ALLISON JOSÉ PIRES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA
DE NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE PARÂMETROS
MOLECULARES E BIOQUÍMICOS EM MODELO DE
DEMÊNCIA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Paulo C.
Lock Silveira

**CRICIÚMA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P667a Pires, Allison José.

Avaliação dos efeitos da administração crônica de nanopartículas de ouro sobre parâmetros moleculares e bioquímicos em modelo de demência em ratos / Allison José Pires ; orientador : Paulo C. Lock Silveira. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.

79 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2015.

1. Nanopartículas de ouro – Uso terapêutico. 2. Alzheimer, Doença de - Tratamento. 3. Demência. 4. Envelhecimento. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

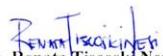
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pelo candidato **Alisson José Pires** sob o título “**Avaliação dos efeitos da administração crônica de nanopartículas de ouro sobre parâmetros moleculares e bioquímicos em modelo de demência em ratos**”, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

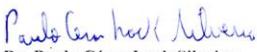
Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito **A** .

Criciúma, SC, 30 de janeiro de 2015


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Membro Relator


Prof. Dra. Gabriela Kozuchovski Ferreira
Membro Externo


Prof. Dra. Renata Tiscoski Nesi
Membro Externo


Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira
Orientador


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e foi apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício e as Nanopartículas de ouro foram sintetizadas no Laboratório de Síntese de Complexos Funcionais, ambos do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico este trabalho às pessoas demenciadas, seus familiares e amigos que vivenciam diariamente o sofrimento de quem está esquecendo seus nomes, suas histórias e, finalmente, como gerir suas vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todas as coisas, pela minha vida e por ter abençoado este trabalho.

À minha esposa Adrianna e ao meu filho Allison Matheus, pelo incentivo, compreensão e apoio incondicional no desenvolvimento deste projeto. Certamente se não fosse por eles eu não teria ingressado no Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde - Mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira, agradeço imensamente pela paciência, empenho e dedicação. Compartilhou suas ideias e conhecimentos em prol do desenvolvimento científico e do meu crescimento acadêmico. Estou convencido que suas pesquisas com as Nanopartículas de Ouro e sua aplicabilidade clínica revolucionarão a comunidade científica e o maior beneficiário será a sociedade.

A minha profunda gratidão ao LAFIBE, doutores, doutorandos, mestres, mestrandos e aos alunos de iniciação científica pela dedicação, sugestões e acolhimento no decorrer destes anos, sem vocês seria impossível concluir mais esta etapa. Aos “guerreiros” alunos da iniciação científica, pelo trabalho árduo que desenvolveram durante esta pesquisa que avançaram os horários de almoço e finais de semana.

A Franciani Rodrigues da Rocha que muito me ajudou nesta fase final do trabalho, complementando-o com novos artigos, e sempre prestativa a colaborar.

Ao prof. Dr. Ricardo Aurino Pinho pelas suas sábias intervenções durante os seminários especializados que muito me serviram para ampliar meus conhecimentos.

Ao prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza, professor do LAFIBE e coordenador do PPGCS pelo empenho e compreensão.

Aos professores do PPGCS pelos ensinamentos.

A banca pela avaliação deste trabalho, complementando-o com seus conhecimentos.

E por fim, obrigado a UNESC e a CAPES.

“Não se conformem com este mundo, mas transformem-se pela renovação da sua mente, assim vocês serão capazes de experimentar e comprovar a boa, agradável e perfeita vontade de Deus.”

Apóstolo Paulo – Carta aos Romanos, cap. 12 v.2

RESUMO

Com o aumento progressivo da expectativa de vida e conseqüentemente do envelhecimento populacional, doenças crônicas degenerativas, em particular os quadros demenciais como a Doença de Alzheimer (DA), se tornaram cada vez mais prevalentes. As alterações histopatológicas características da DA são placas neuríticas (senil) formadas pelo peptídeo β -Amilóide 40/42 ($A\beta$ 40/42) e os emaranhados neurofibrilares composta por agregados de proteína TAU hiperfosforilado (fosfo-TAU). Também ocorre distrofia de neurônios, gliose e perda neuronal. Um crescente corpo de evidências implica deficiências na via de sinalização da insulina no cérebro com o desenvolvimento de β -Amilóide e hiperfosforilação de tau. Além disso, alguns estudos demonstram que a insulina apresenta ação neuroprotetora contra os efeitos deletérios da neuroinflamação e estresse oxidativo no SNC. O modelo de resistência cerebral à insulina via administração intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) replica alguns achados bioquímicos em pacientes com DA como diminuição da glicose cerebral, do metabolismo energético, redução do fluxo sanguíneo cerebral, estresse oxidativo e disfunção colinérgica. As Nanopartículas de Ouro (GNP) possui efeito anti-inflamatório e antioxidante e têm sido utilizado em pesquisas com ótimos resultados em modelo animal de Diabetes Mellitus, porém seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração crônica de GNP sobre parâmetros moleculares e bioquímicos após injeção ICV de STZ em cérebro de ratos jovens. Os animais foram distribuídos randomicamente em 6 grupos experimentais: “G1” – Sham; “G2” - STZ; “G3” – STZ + GNP 24h; “G4” – STZ + GNP 48h; “G5” - Sham + GNP 24h e “G6” – Sham + GNP 48h. Os animais foram anestesiados e logo após foi realizado injeções ICV bilaterais de STZ (3mg/kg). O tratamento com GNP foi realizado por injeção intraperitoneal na dose de 2,5 mg/L com tamanho de partícula de 20 nm. A frequência de administração de GNP foi a intervalos de 24h para os grupos G3 e G5 e 48h para os grupos G4 e G6 durante 21 dias. Após este período foi realizado a cirurgia estereotáxica e posterior análises. A distribuição de GNP no tecido cerebral, hepático e muscular foi similar em todos os grupos, porém a concentração cerebral foi maior nos grupos G3 e G4. Ocorreu um aumento dos níveis de NF- κ B e IL-1 β no grupo STZ em relação ao Sham e uma redução significativa de NF- κ B no grupo STZ + GNP 48h. O grupo STZ induziu um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, aumento nos

níveis de danos oxidativos e uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes e nos níveis de Glutathione (GSH) em relação ao Sham, entretanto, o grupo STZ + GNP 48h reverteu essas alterações. Além disso, o percentual de sobrevivência foi de 25%, 35% e 65% para os grupos 2, 3 e 4 respectivamente. Os resultados obtidos por este estudo apontam à GNP como um promissor tratamento da Doença de Alzheimer, contudo, mais estudos devem ser direcionados para melhor compreensão do papel das GNP.

Palavras Chave: Demência; doença de Alzheimer; envelhecimento; estresse oxidativo; inflamação; nanopartículas de ouro; sinalização de insulina;

ABSTRACT

With the increase in life expectancy and consequent aging of the population chronic degenerative diseases, particularly dementia such as Alzheimer's Disease (AD), have become increasingly prevalent. The histopathological changes characteristic of AD are neuritic plaques (senile) formed by the β -amyloid peptide 40/42 (40/42 Ab) and neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated Tau protein aggregates (phospho-tau). Additional changes include dystrophy of neurons, gliosis and neuronal loss. Growing bodies of evidence suggest a link between deficiencies in the insulin signaling pathway and the development of brain β -amyloid and tau hyperphosphorylation. In addition, some studies have shown that insulin has a neuroprotective effect against the deleterious effects of neuroinflammation and oxidative stress in the CNS. The process of brain insulin resistance via intracerebroventricular (ICV) administration of streptozotocin (STZ) in rats replicates some biochemical findings seen in patients with AD such as decreased cerebral glucose, energy metabolism, reduced cerebral blood flow, oxidative stress and cholinergic dysfunction. The gold nanoparticles (GNP) have an anti-inflammatory and antioxidant effect and have been used to great success in animal trials researching diabetes mellitus, but exactly how it works is still unclear. The objective of this study was to evaluate the effects of chronic administration of GNP on molecular and biochemical parameters after ICV injection of STZ in the brains of young rats. The animals were randomized into 6 groups: "G1" – Sham; "G2" - STZ; "G3" - STZ + GNP 24 hours; "G4" - STZ + GNP 48 hours; "G5" – Sham + GNP 24 hours and "G6" – Sham + GNP 48 hours. The animals were anesthetized and after ICV received bilateral injections of STZ (3mg/kg). The GNP was administered via intraperitoneal injection at a dose of 2.5mg/L with a particle size of 20nm at intervals of 24 and 48 hours until the twenty-first day after which stereotactic surgery and subsequent analysis were performed. The findings were as follows: 1) The distribution of GNP in the brain, liver and muscle tissue was similar in all groups, however, the brain concentration was higher in the groups G3 and G4; 2) There was an increase in NF-kB and IL-1 β in group G2 compared to G1 and a significant reduction of NF-kB in group G4. 3) Group G2 induced an increase in the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS), increased levels of oxidative damage and a decrease in the activity of antioxidant enzymes and levels of Glutathione (GSH) compared to group G1, however, group G4 reversed

these changes. Additionally, the survival percentage was 25%, 35% and 65% for group G2, G3 and G4 respectively. The results of this study suggest that GNP is a promising treatment of AD, however, more studies should be conducted to better understand the role of GNP.

Keywords: Aging; Alzheimer's disease; dementia; gold nanoparticles; inflammation; insulin signaling; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da clivagem da Proteína Precursora Amilóide (PPA) por enzimas secretases	35
Figura 2 – Fosforilação da Proteína Tau (fosfo – Tau) e formação de emaranhados neurofibrilares	36
Figura 3 - Representação esquemática da mediação do processo inflamatório pelaTNF- α e consequente ativação das vias de estresse de células, inibição do IRS1, danos em sinapses e perda da memória.....	39
Figura 4 - Cascata de sinalização de insulina no cérebro.....	41
Figura 5 - Representação esquemática das vias moleculares que ligam a resistência à insulina e Doença de Alzheimer (DA).....	43
Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro (GNP) com diâmetro de 20 nm.....	50
Figura 7 - Níveis proteicos de NF-kB (7A) e IL-1 β (7B).....	57
Figura 8 - Níveis de Superóxido (8A), oxidação de DCFH-DA (8B), níveis de nitrito (8C) e produção de peróxido de hidrogênio (8D)	58
Figura 9 - Níveis de Carbonilação de Proteínas (9A) e oxidação de tióis (9B)	59
Figura 10 - Sistema antioxidante: superóxido dismutase - SOD (10A), glutatona peroxidase - GPX (10B), catalase - CAT (10C) e Glutaciona - GSH (10D)	60
Figura 11 - Efeito da administração crônica de GNP sobre o percentual de sobrevivida	61

LISTA DE ABREVIATURAS

- A β - Beta amiloide (do inglês, *amyloid beta*)
AGE - Produto final da glicosilação avançada (do inglês, *end product of advanced glycosylation*)
AKT - Proteína Cinase B (PKB) (do inglês, *Protein kinase B*)
ANLS - Transporte de Lactato Astrócito – Neurônio (do inglês, *Astrocyte – Neuron Lactate Shuttle*)
ATP - Trifosfato de Adenosina (do inglês, *Adenosin triphosphate*)
 β -APP- Proteína precursora beta amiloide (do inglês, *amyloid precursor protein*)
BCL-2 - Linfoma de Células B tipo 2 (do inglês, *B-Cell Lymphoma 2*)
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (do inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*)
BHE - Barreira Hemato – Encefálica
BrdU - 5-Bromodeoxiuridina
CAT - Catalase
DA - Doença de Alzheimer
DCFH-DA - 2',7'-Diclorofluoresceína-diacetato (do inglês, *2',7' Dichlorodihydrofluorescein diacetate*)
DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
ERK - Quinase Regulada por Sinal Extracelular (do inglês, *Extracellular signal Regulated kinas*)
ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
FGF-2 - Fator de Crescimento de Fibroblastos 2 (do inglês, *Fibroblast Growth Factor 2*)
FOXO - Fatores proteicos responsáveis pela transcrição gênica (sem tradução livre para o português) (do inglês, *Forkhead Box*)
GABA - Ácido Gama Aminobutírico (do inglês, *Gamma-Aminobutyric acid*)
GFAP - Proteína Glial Fibrilar Ácida (do inglês, *Glial Fibrillary Acidic Protein*)
Glut-3 - Transportador de Glicose tipo 3
GNP - Nanopartículas de ouro (do inglês, *Golden Nanoparticles*)
GPX - Glutathiona Peroxidase (do inglês, *Glutathione peroxidase*)
GSH - Glutathiona (do inglês, *Glutathione*)
GSK3- β - Glicogênio cinase 3 (do inglês, *Glycogen Synthase Kinase 3*)
ICV- Intracerebroventricular)

IGF-I - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo I (do inglês, *Insulin Growth Factor-I*)

IR - Receptor de Insulina (do inglês, *Insulin receptor*)

IRS-2 - Substrato do Receptor de Insulina tipo 2 (do inglês, *Insulin Receptor Substrate 2*)

LRP-2 – Receptor proteico 2 de lipoproteína de baixa densidade(do inglês, *Low-density lipoprotein receptor-related protein 2*)

MAPK - Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (do inglês, *Mitogen – Activated Protein Kinase*)

mTOR - Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos (do inglês, *Mammalian Target of Rapamycin*)

NADPH - Adenosina Nicotinamina Fosfato Oxidase (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*)

NF-κB - Factor Nuclear Kappa B (do inglês, *Nuclear factor-kappa B*)

NINCDS-ADRDA - Instituto Nacional para comunicação de Desordens e Derrame – Associação de Doença de Alzheimer e Desordens Relacionadas (do inglês, *National Institute for Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association*)

PGC1-α – Proliferador de peroxissoma Ativado, Receptor Gamma Coativador 1 α (do inglês, *Peroxisome Proliferator - Activated Receptor Gamma Coactivator 1- α*)

PI3K - Fosfatidilinositol 3 Cinase (do inglês, *Phosphatidylinositol 3 – Kinase*)

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonilo (do inglês, *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*)

RAS - Vírus do sarcoma de rato (do inglês, *Rat Sarcoma Vírus*)

RI - Receptor de Insulina

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido Dismutase

STZ – Estrepto-zotocina (do inglês, *Streptozotocin*)

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

TNF - Fator de Necrose Tumoral (do inglês, *Tumor necrosis fator*)

TrkB – Tirosina Quinase B (do inglês, *Tyrosine – Related Kinase B*)

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
1.1 ENVELHECIMENTO	31
1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)	33
1.3 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER	34
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DE ALZHEIMER (DA).....	37
1.5 INFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)	38
1.6 SINALIZAÇÃO DE INSULINA NO CÉREBRO	39
1.7 MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ).....	43
1.8 NANOPARTÍCULAS DE OURO (GOLD NANOPARTICLES - GNP)	44
2 JUSTIFICATIVA	46
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 QUESTÕES ÉTICAS	48
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	48
4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE OURO (GNP).....	48
4.4 INDUÇÃO DO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATAMENTO..	50
4.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE OURO NOS TECIDOS.....	51
4.6 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DO TECIDO.....	51
4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	52
4.7.1 Produção de Peróxido de Hidrogênio.....	52
4.7.2 Ânion Superóxido.....	52
4.7.3 Diclorofluoresceína - DCFH-DA.....	52
4.7.4 Indicador da Formação de Oxido Nítrico (NO).....	53
4.7.5 Conteúdo de Proteínas Oxidadas.....	53
4.7.6 Carbonilação de Proteínas.....	53
4.7.7 Superóxido Dismutase (SOD).....	53
4.7.8 Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPX).....	54
4.7.9 Atividade da Catalase (CAT)	54
4.7.10 Glutathiona (GSH)	54
4.7.11 Conteúdo de Proteínas	54
4.8 WESTERN BLOTTING	55
4.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	55

5 RESULTADOS.....	56
5.1 DETERMINAÇÕES TECIDUAIS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	56
5.2 MOLÉCULAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	56
5.3 PRODUÇÃO DE OXIDANTES.....	57
5.4 DANOS OXIDATIVOS	58
5.5 SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	59
5.6 PORCENTUAIS DE SOBREVIVÊNCIA	61
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO	78
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é um processo biológico inevitável e caracterizado por declínio geral das funções fisiológicas, isto é contrabalançado por reparo e fatores de manutenção que contribuem para a longevidade do organismo. Assim, Beckman e Ames (1998) definiram o envelhecimento como um fenômeno multifatorial associado com a diminuição das funções fisiológicas e celulares, ao aumento na incidência de numerosas doenças degenerativas e à diminuição da capacidade para responder ao estresse. O processo de envelhecimento pode ser definido como um declínio progressivo das funções fisiológicas de um organismo depois da fase reprodutiva da vida (Valko et al., 2007).

Fatores biológicos, psicológicos e sociais são alguns dos fenômenos relativos que compreendem o envelhecimento e atingem ao homem e sua existência na sociedade. Tais processos têm uma dimensão existencial que se reveste de características biopsíquicas, sociais e culturais (Stoppe, 1994). A nível celular, o envelhecimento pode ser descrito como mudanças graduais na fisiologia molecular da célula, que provoca uma diminuição das suas funções normais (Mansour et al., 2008). Várias hipóteses sobre os mecanismos de envelhecimento têm sido desenvolvidas, e estes podem não ser uniformes em todas as células e órgãos. Comum à maioria dos modelos de envelhecimento é a ideia de que mudança gradual na estrutura original do ácido desoxirribonucleico (DNA) é uma causa básica importante. A teoria da mutação somática do envelhecimento propõe que este processo ocorre em virtude de um acúmulo de mutações no DNA em células somáticas ao longo do tempo (Mansour et al., 2008).

Apesar do avanço científico, o conhecimento sobre as causas do envelhecimento ainda é muito limitado. Por questões éticas, as pesquisas experimentais não podem ser realizadas em seres humanos e têm sido desenvolvidas em modelos animais, destacando-se os roedores. No entanto, para que os resultados dos trabalhos experimentais tornem-se relevantes para a compreensão do envelhecimento, os mecanismos analisados precisam ser comuns aos seres humanos, o que nem sempre acontece (Partridge, 2002).

Várias são as teorias propostas para explicar o envelhecimento. Segundo Medvedev (1990), existem mais de 300 teorias, muitas das quais não se contradizem e até mesmo se apoiam umas nas outras, muito

provavelmente por tratarem o assunto sob vários aspectos e de forma diferente e independente.

Teixeira e Guariento (2010) em seu artigo apresenta uma revisão das teorias biológicas do envelhecimento e discute os mecanismos relevantes para explicar o processo. Weinert e Timiras (2003), propuseram a classificação das teorias e mecanismos biológicos do envelhecimento em três categorias: evolutiva, celular-molecular e sistêmica.

Nas últimas duas décadas, diversas evidências diretas e indiretas têm demonstrado uma relação positiva entre o aumento do estresse oxidativo *in vivo* e o envelhecimento. Os estudos demonstraram vários tipos de danos no DNA acumulados durante a idade e as possibilidades de ser o estresse oxidativo o grande contribuinte deste processo, principalmente em roedores (Bonassi et al., 1995; Larmarcovai et al., 2007; Wojda et al., 2007; Heuser et al., 2008).

Com relação ao envelhecimento cerebral, sabe-se que o mesmo é acompanhado por mudanças na função cognitiva e alterações na anatomia do cérebro, fisiologia e neuroquímica. A taxa e a magnitude da mudança, no entanto, varia substancialmente entre o cérebro dos indivíduos, regiões e domínios funcionais (Kosik et al., 2012). Existem duas teorias principais sobre o envelhecimento cerebral. A primeira defende que existem alterações geneticamente programadas de aparecimento tardio, como o encurtamento progressivo dos telômeros nas divisões celulares. E a segunda inclui alterações celulares resultantes de danos ou erros que se acumulam ao longo do tempo. É provável que a susceptibilidade aumentada ao estresse metabólico possa ser devido a uma combinação de fatores relativos às duas teorias. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e mutações do DNA nuclear e mitocondrial causados por danos induzidos por radiação, por exemplo, podem ser incluídos na enorme gama de fatores relacionados aos processos de senescência celular (Shetty et al., 2011).

O crescimento da população idosa é um fenômeno mundial e, no Brasil, as modificações ocorrem de forma radical e bastante acelerada (Carvalho, 2003). O número de idosos no Brasil passou de 3 milhões, em 1960, para 7 milhões, em 1975, e 20 milhões em 2008 – um aumento de quase 700% em menos de 50 anos. O último censo de 2010 revelou que 10,78% da população brasileira é composta por pessoas acima de 60 anos (Brasil, 2010). As projeções mais conservadoras indicam que, em 2020, o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos, com um contingente superior a 30 milhões de pessoas (Veras, 2009).

Consequentemente, doenças próprias do envelhecimento passaram a ganhar maior expressão no conjunto da sociedade.

Com o aumento progressivo da expectativa de vida e consequentemente do envelhecimento populacional, doenças crônicas degenerativas, em particular os quadros demenciais como a Doença de Alzheimer (DA), se tornaram cada vez mais prevalentes, ocasionando um sério problema para os sistemas de saúde (Wiltfang et al., 2009).

1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

A DA é uma enfermidade neurológica degenerativa, progressiva e irreversível, que começa de forma insidiosa, e se caracteriza por perdas graduais da função cognitiva, distúrbios de afeto e comportamento (Holanda et al., 2012). Nos estágios iniciais, é comum a perda de memória esporádica e dificuldades na aquisição de novas habilidades, evoluindo gradativamente com perdas cognitivas importantes (Randall et al., 2012). Nos estágios intermediários, pode ocorrer a apraxia e a afasia fluente que se apresenta como dificuldade para nomear objetos ou para escolher a palavra adequada para expressar uma ideia. Nos estágios terminais, encontram-se acentuadas alterações do ciclo sono-vigília, alterações comportamentais, como irritabilidade e agressividade, sintomas psicóticos, incapacidade de deambular, falar e realizar cuidados pessoais (Holanda et al., 2012).

As estimativas de crescimento da prevalência de DA nas próximas décadas apontam para proporções epidêmicas em escala mundial (Diniz, 2007), uma vez que sua incidência duplica a cada 5 anos a partir de 65 anos de idade (Aprahamian et al., 2009). Estatísticas americanas revelam que atualmente existem mais de 5 milhões de pessoas portadoras de DA com expectativa de aumento para 13 milhões para o ano de 2050 (Randall et al., 2012).

No Brasil, a estatística é muito semelhante à mundial, com uma prevalência em torno de 1,5 – 3% aos 65 anos, com um aumento para 30 - 47% aos 80 anos de idade (Aprahamian et al., 2009) . Em estudo populacional realizado em Catanduva, município com 100 mil habitantes, no Estado de São Paulo, 25% dos idosos foram avaliados, encontrando prevalência de demência semelhante à literatura, como uma taxa de incidência anual de 7,7 casos por 100.000 habitantes (Nitrini et al., 2004).

Com o aumento da prevalência desta doença os custos sociais e financeiros elevam-se na mesma proporção. No ano de 2010 o custo estimado no cuidado de pacientes com Doença de Alzheimer nos

Estados Unidos foi de mais de 172 bilhões de dólares (Brookmeyer, 2011).

O diagnóstico de demência e DA obedecem a critérios clínicos da American Psychiatric Association (APA, 2000) e da *National Institute for Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA), respectivamente (Dubois et al., 2007). O Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia elaborou as primeiras recomendações para o diagnóstico de DA no Brasil, onde primeiramente é necessário caracterizar o quadro demencial e posteriormente, de acordo com as características clínicas, classifica-la em demência da DA Provável, Possível e Definida (Frota et al., 2011). Demência da doença de Alzheimer definida: Preenche os critérios clínicos e cognitivos para DA e exame neuropatológico com alterações características segundo os critérios do grupo de trabalho do National Institute on Aging (NIA) e do Reagan Institute Working Group (Hyman e Trojanowski, 1997; Frota et al., 2011).

O diagnóstico definitivo se baseia em achados histopatológicos *post-mortem* obtidos de áreas cerebrais normalmente afetadas nesta doença (Price et al., 2009), nestes achados evidencia-se abundantes emaranhados neurofibrilares e placas neuríticas com acúmulo da proteína precursora β -Amilóide que acompanha depósitos nas placas e paredes dos vasos (de la Monte et al., 2008), porém estudos recentes demonstraram que tais alterações já estão presentes entre 10 e 15 anos antes das primeiras alterações clínicas (Randall et al., 2012).

1.3 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER

As alterações histopatológicas características de DA são placas neuríticas (senil) e os emaranhados neurofibrilares, também ocorrendo distrofia de neuritos, gliose e perda neuronal. As placas neuríticas são lesões extracelulares formado pelos peptídeos β -Amilóide ($A\beta$) 40 e 42 ($A\beta$ 40 e 42), já os emaranhados neurofibrilares são lesões intraneuronais composta por agregados de proteína TAU hiperfosforilado (fosfo-TAU) (Paula et al., 2009).

As placas de β -Amilóide são compostas principalmente de peptídeos originados a partir da clivagem enzimática da proteína precursora do β -Amilóide (β -APP) (Wiltfang et al., 2009). A β -APP é uma proteína transmembrana abundante no sistema nervoso central (SNC), sendo processada enzimaticamente pelas secretases α , β e γ para liberar varias

formas de peptídeo β -Amilóide, principalmente as subunidades 40 e 42. Os $A\beta$ 42 são liberados como monômeros que, progressivamente agregam-se em dímeros, trímeros, oligômeros, para finalmente formar a placa madura de $A\beta$, que é neurotóxica desempenhando papel importante na patogênese da DA (Paula et al., 2009).

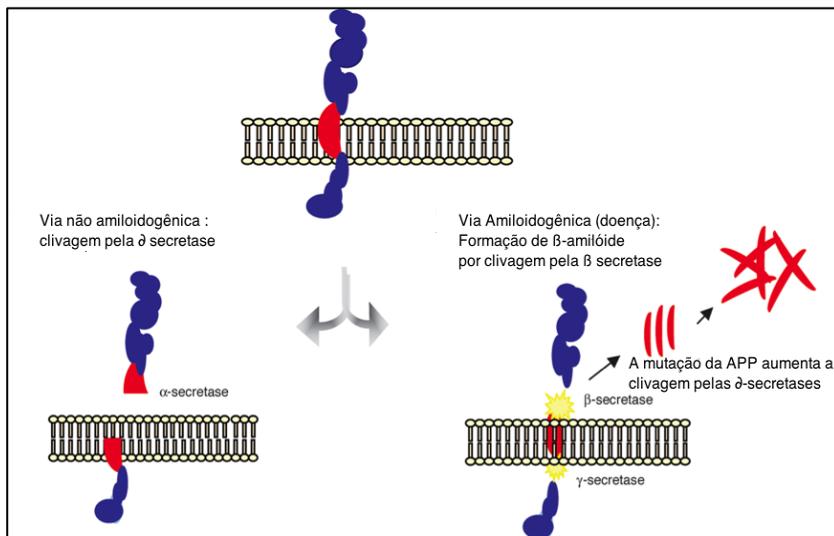


Figura 1 – Representação esquemática da clivagem da Proteína Precursora Amilóide (PPA) por enzimas secretases

A proteína precursora amilóide (APP) é uma proteína transmembrana clivada por enzimas secretase. Na via não-amiloidogênica, APP é clivada, preferencialmente, por alfa secretase. Na via amiloidogênica, peptídeos beta Amilóide neurotóxicos são liberados após clivagem sequencial de APP pela banda gama secretases, e ainda acumular em agregados oligoméricas

Fonte: adaptado de Paula et al. (2009).

As proteínas Tau pertencem à família de proteínas associadas aos microtúbulos (do inglês, microtubule-associate proteins – MAPs) encontradas em células neuronais e não neuronais (Buée et al., 2000). A principal função é se ligar, estabilizar e promover associação dos microtúbulos (Monteiro et al., 2011). A Tau parece regular o tráfego intracelular de vesículas e inibir o transporte da proteína precursora de amilóide para as extensões neuronais, o que leva ao acúmulo destas no corpo celular (Stamer et al., 2002). A fosforilação da Tau leva à diminuição da sua capacidade de se ligar aos microtúbulos e de promover montagem do esqueleto microtubular, aumentando assim a

instabilidade dinâmica dos mesmos. No cérebro de pacientes com DA, moléculas hiperfosforiladas da proteína Tau agregam-se para formar inclusões filamentosas intraneurais, os emaranhados neurofibrilares (Wiltfang et al., 2009).

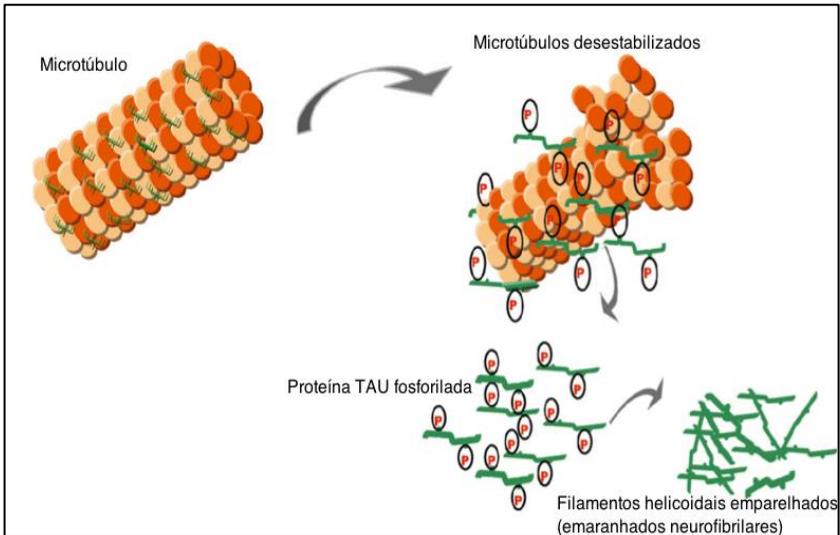


Figura 2 – Fosforilação da Proteína Tau (fosfo – Tau) e formação de emaranhados neurofibrilares

Fonte: adaptado de Paula et al. (2009).

Um crescente corpo de evidências implica deficiências na via de sinalização da insulina no cérebro na DA (de la Monte e Wands, 2005). Uma vez que a insulina tem sido demonstrado que afetam tanto os níveis de β -Amilóide e hiperfosforilação de Tau no cérebro, este problema tem emergido recentemente como um novo campo de pesquisa sobre a etiopatogenia da doença (de la Monte et al., 2006; Salkovic-Petrisic e Hoyer, 2007).

As alterações cerebrais das vias de insulina/IGF1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo I, do inglês “Insulin Growth Factor-I”) podem causar disfunção mitocondrial e aumentar os danos por estresse oxidativo nas células neurais. Acredita-se que o estado cerebral de resistência à insulina pode desempenhar um papel crucial na patogênese de doenças neurodegenerativas incluindo DA (Muller et al., 2012).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

A DA possui alterações histopatológicas, molecular e bioquímica, incluindo a perda de células e possui abundantes emaranhados neurofibrilares, metabolismo energético prejudicado, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo crônico e danos no DNA (de la Monte et al., 2008). O estresse oxidativo é uma condição biológica decorrente do desequilíbrio entre a produção de oxidantes e o potencial antioxidante das células, conduzindo à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres (Barnham et al., 2004).

Este desequilíbrio pode ser estimado avaliando a atividade das enzimas envolvidas no balanço redox da célula, que incluem: superóxido dismutase que dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e a glutatona peroxidase e catalase que convertem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A conversão de peróxido de hidrogênio pela glutatona peroxidase ocorre coincidentemente com a oxidação da glutatona reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG). Lipídios, proteínas e grupos sulfidrilas, são compostos que podem ser modificados pela ação de radicais livres, e são também usados como medidas indiretas do estresse oxidativo (Silva et al., 2011).

O tecido cerebral é altamente suscetível ao estresse oxidativo devido a sua maior taxa de consumo de oxigênio, alto teor de ácidos graxos, menor capacidade regenerativa e baixas quantidades de antioxidantes. Assim, os radicais livres parecem desempenhar um papel fundamental no processo de envelhecimento cerebral. O estresse oxidativo causado pela produção excessiva de ROS no cérebro tem sido considerada como a causa subjacente para a patogênese de diversas doenças neurodegenerativas (Rege et al., 2014), e este está implicado na Doença de Alzheimer e torna-se uma característica proeminente e precoce da doença (Zhou et al., 2013).

O diabetes pode alterar a atividade dessas enzimas em vários tecidos e com isto pode ocasionar um aumento na produção de ROS, neste caso, pode ser devida à auto-oxidação da glicose, a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), à via dos polióis e também às mudanças no conteúdo e atividade no sistema de defesa antioxidante no tecido (Silva et al., 2011).

Uma disfunção mitocondrial exacerba a produção de espécies reativas de oxigênio principalmente superóxido e peróxido de hidrogênio, e consequentemente aumenta a oxidação de lipídeos, proteínas e ácido nucléicos induzindo uma vulnerabilidade neuronal e isso pode estar intimamente ligado à Doença de Alzheimer (Correia et al., 2011).

1.5 INFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

O papel da inflamação na DA foi observado cerca de quatro décadas atrás. Foi possível identificar células imunitárias elevadas e citocinas pró-inflamatórias no cérebro na DA, além disso, vários estudos demonstraram o envolvimento de uma resposta inflamatória como um dos mecanismos da fisiopatologia da DA (Wilkins et al., 2014). A inflamação é observada nos cérebros de indivíduos com DA, porém o que sustenta isso não é claro, pois nenhum agente infeccioso externo esta presente. Isto sugere que ela é produzida internamente apresentando um padrão molecular associado ao dano neuronal que pode ser devido a uma grande ativação de astrócitos que é característico na DA (Xu, 2014). Enquanto uma resposta imediata a um patógeno invasor é benéfico, uma reação inflamatória sustentada irá provocar danos nos tecidos e declínio funcional (Wilkins et al., 2014).

A inflamação faz parte dos mecanismos de defesa do organismo contra as múltiplas ameaças, incluindo as infecções e lesões. O processo inflamatório é complexo e envolve fatores solúveis e células especializadas que são mobilizados para neutralizar e restaurar a fisiologia normal do corpo. Este processo pode ocorrer no cérebro e nos tecidos periféricos. No cérebro, as células gliais, em especial os astrócitos, microglia são submetidos a ativação sob os mediadores pró-inflamatórios. A inflamação desempenha um papel crítico na patogênese da DA e doenças metabólicas, incluindo a diabetes de tipo 2 (Ferreira, 2014).

Vários estudos estabeleceram a presença de marcadores inflamatórios no cérebro nos indivíduos com DA, incluindo níveis elevados de citocinas/quimiocinas e gliose (microgliose). Além disso, no sangue destes indivíduos observa-se concentrações aumentadas dos mediadores inflamatórios, incluindo Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), interleucina (IL) 6 (IL-6), e IL-1 β . Todavia, a ativação dos macrófagos e a infiltração no tecido adiposo são características da fisiopatologia dos diversos distúrbios metabólicos decorrente da produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α . Assim, tanto no cérebro quanto em tecidos periféricos, a inflamação torna-se prejudicial, o que leva a progressivos danos nas doenças degenerativas (De Felice e Ferreira, 2014).

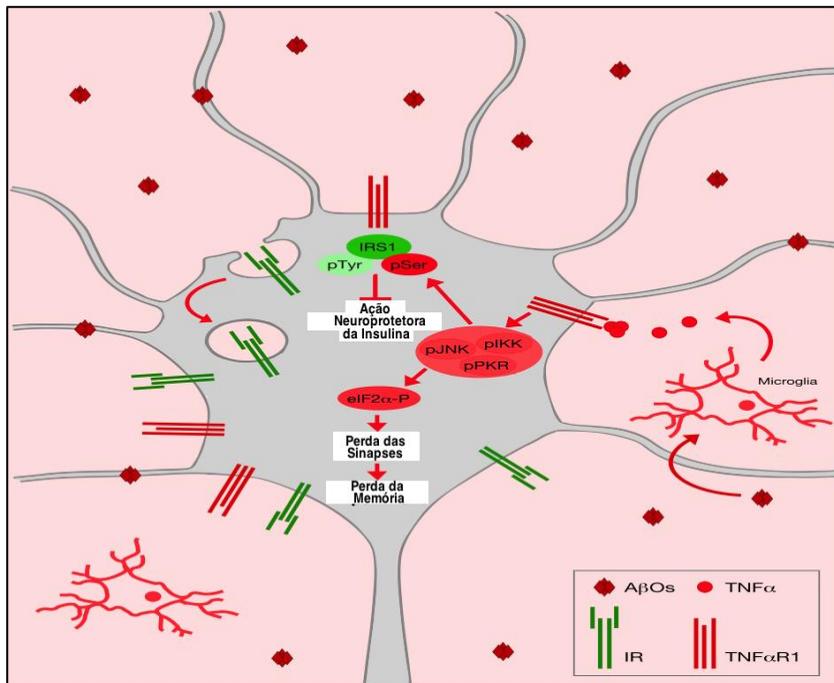


Figura 3 - Representação esquemática da mediação do processo inflamatório pela $TNF-\alpha$ e consequente ativação das vias de estresse de células, inibição do IRS1, danos em sinapses e perda da memória

A sinalização de $TNF-\alpha$ ativa as vias de estresse de células e provoca a inibição do IRS-1, danos de sinapses e perda de memória em DA. Ativação da microglia por APP resulta em aumento da produção / liberação de $TNF-\alpha$. A ativação do receptor de $TNF-\alpha$ neuronal induz a ativação aberrante de quinases de estresse (JNK, IKK, e PKR) e estresse ER (fosforilação PKR mediada de eIF2a-P). Serina fosforilada do IRS-1 inibe a fosforilação da tirosina a partir de IRS-1 induzido pela insulina. Isto interfere com a capacidade do IRS-1 para engatar na sinalização da insulina e bloqueia as ações intracelulares de insulina. Sinalização da insulina reduzido aumenta a vulnerabilidade a danos sinapse neuronal induzida por APP, levando a diminuição da memória
Fonte: adaptado de De Felice e Ferreira (2014).

1.6 SINALIZAÇÃO DE INSULINA NO CÉREBRO

A insulina é um hormônio peptídico de 51 aminoácidos, sintetizado e secretado pelas células β -pancreáticas em resposta a elevação plasmática dos níveis de glicose. Esse hormônio controla funções energéticas vitais,

como metabolismo da glicose, de proteínas e de lipídios (Saltiel e Kahn, 2001).

Praticamente todos os tecidos são sensíveis à sinalização de insulina, entretanto alguns tecidos apresentam maior sensibilidade como músculos, fígado e tecido adiposo. Como outros hormônios, a insulina se liga especificamente em seu receptor, entretanto é considerado um hormônio pleiotrópico pela sua múltipla atividade sobre diversas cascatas de sinalização. Além disso, a sinalização desse hormônio regula processos metabólicos como transporte de glicose, glicogênese, síntese de lipídeos e ainda é capaz de modificar a expressão de genes específicos (Fulop et al., 2003).

As ações biológicas da insulina são mediadas por receptores de membrana celular, que apresentam atividade tirosina quinase intrínseca. O receptor da insulina (IR) é uma proteína heterotetramérica formada por duas subunidades α extracelulares, dispostas simetricamente e que se ligam, cada uma delas, por pontes de dissulfeto a uma subunidade β transmembrânica, com domínio intracelular, que possui atividade tirosina quinase intrínseca (Saltiel e Kahn, 2001).

A sinalização da insulina no SNC, na maioria das vezes, é mediada por duas cascatas de sinalização em paralelo: Fosfatidilinositol 3 Cinase (PI3K) - Proteína Cinase B (Akt) e Vírus do sarcoma de rato (RAS) – Proteína Cinase Ativada por Mitógeno (MAPK). A cascata da PI3K – Akt promove a ativação e inibição de proteínas como mTOR, GSK3- β e FOXO estando relacionada com processos chaves para o SNC como: transcrição proteica, apoptose, autofagia e estresse oxidativo. O controle fino das proteínas da cascata PI3K – Akt promove a sobrevivência neuronal, enquanto que a sinalização da RAS – MAPK promove a morte celular (Fernandez e Torres-Aleman, 2012).

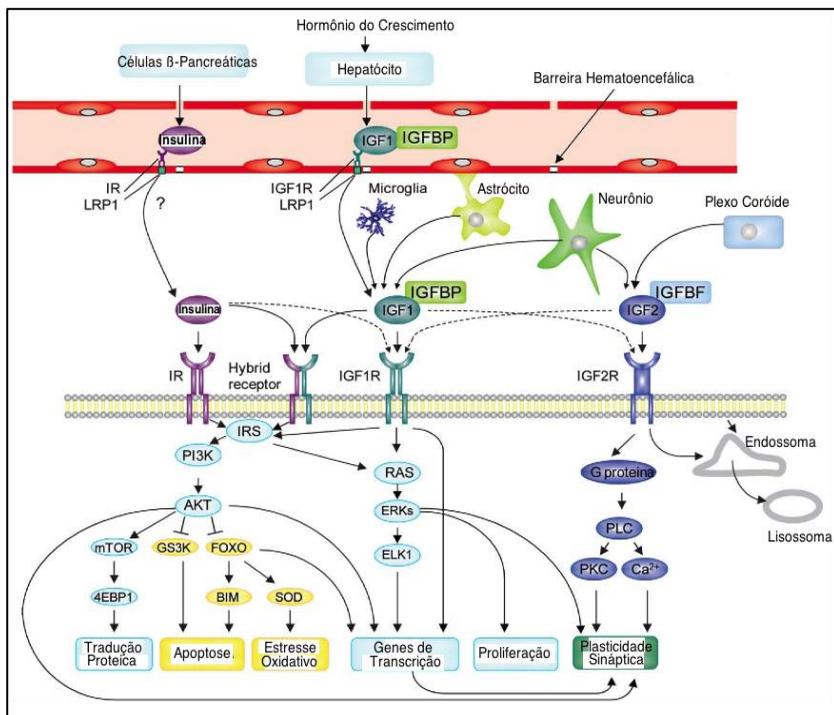


Figura 4 - Cascata de sinalização de insulina no cérebro

Os peptídeos semelhantes à insulina incluem insulina e fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs), incluindo IGF1 e IGF2. As ações biológicas de peptídeos semelhantes à insulina são mediados por três tipos diferentes de receptores: o receptor de insulina (RI), do receptor IGF-1 (IGF1R), e receptores de IGF2 (IGF2R). No cérebro, estes peptídeos actuam como sinais parácrinos por produção local de IGF1 e IGF2 em neurónios, astrócitos, microglia, e epitélio coróide; e sinais endócrinos, através do acesso de insulina e IGF1 que circulam através da barreira sangue-cérebro. Isto envolve o IGF1R e proteína relacionada com receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) 1. IGF2 é sintetizado directamente por o plexo coróide. Biodisponibilidade de IGF1 e IGF2 é regulada pela sua ligação a proteínas de ligação a IGF (IGFBP). Os efeitos da insulina e IGF-1 são mediadas pelo receptor de insulina, IGF1R, ou receptores híbridos, através de proteínas de andaime da família de substrato receptor da insulina (IRS). Isso desencadeia duas vias de sinalização canónicas: o fosfoinosítide 3-quinase (PI3K)-Akt e os relacionados com o sinal RAS-extracelular quinase (ERK) vias; eles ativam múltiplos efetores downstream, incluindo mTOR (mammalian target of rapamycin), glicogénio sintase 3 quinase (GS3K) e Forkhead Box O (FOXO) família de ativadores de transcrição. O IGF2R tem múltiplas funções, incluindo a endocitose e

degradação do lysosomal de ligantes extracelulares; também recruta proteínas G e activa a fosfolipase C (PLC) e proteína cinase C (PKC). BIM 5 mediador da morte de células-interagindo BCL2; ELK-1 5 fator de transcrição ETS-like.

Fonte: adaptado de Fernandez e Torres-Aleman (2012).

Algumas evidências demonstram que a insulina apresenta ação neuroprotetora contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo no SNC. Em 2003, Duarte e colaboradores mostraram que, sobre condições de estresse oxidativo, a insulina é capaz de reverter a diminuição da captação de glutamato e ácido gama amino butírico (GABA) (Duarte et al., 2003). Esses autores também demonstraram que os mecanismos de neuroproteção da insulina não envolvem diminuição da peroxidação lipídica avaliado por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Ainda, a estimulação da captação e metabolismo de glicose, no SNC, estaria relacionada com os mecanismos neuroprotetores da insulina contra o estresse oxidativo (Duarte et al., 2006). Aparentemente, a insulina poderia causar aumento da atividade de proteínas, como a hexoquinase-II e família de proteínas Bcl-2 (anti-apoptóticas) e diminuição da caspase-3, aumentando o metabolismo da glicose e melhorando as defesas antioxidantes neuronais (Duarte et al., 2012).

De La Monte e colaboradores (2008), evidenciaram na pesquisa de revisão que: (1) O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) provoca resistência à insulina no cérebro, estresse oxidativo e comprometimento cognitivo, porém mencionam que os seus efeitos agregados estão longe de imitar DA (2) grandes danos na sinalização da insulina no cérebro e no mecanismo de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), representam anormalidades precoces e progressivas e poderiam ser responsáveis pela maioria das lesões moleculares, bioquímicas e histopatológicas em DA. (3) O diabetes cerebral experimental produzida através da administração intracerebral de estreptozotocina (STZ) ocasiona muitas características da DA, incluindo comprometimento cognitivo e distúrbios na homeostase acetilcolina e (4) a diabetes cerebral experimental pode ser tratada com agentes sensibilizadores de insulina, ou seja, as drogas usadas atualmente para tratar o DM2 (la Monte et al., 2008).

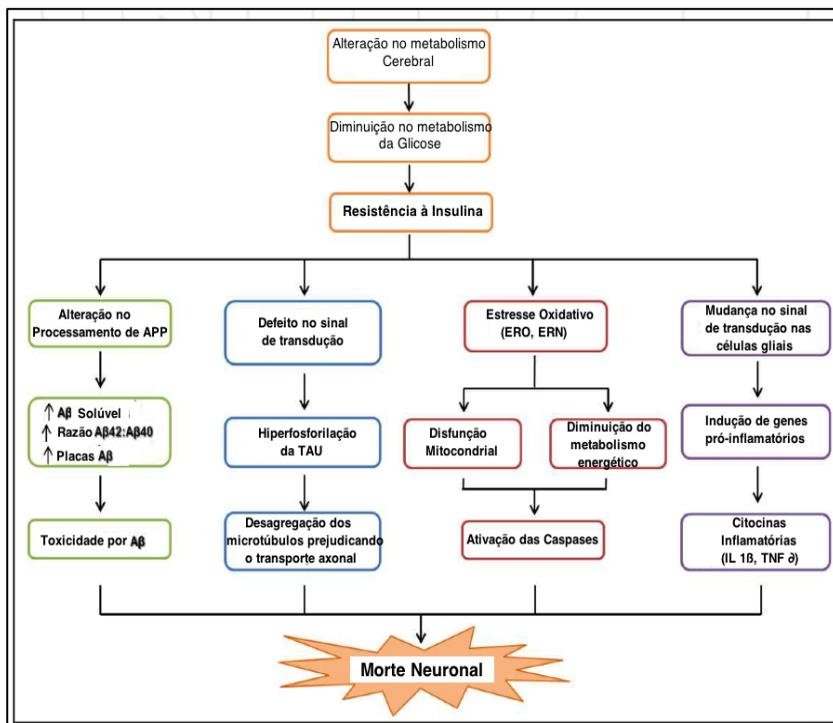


Figura 5 - Representação esquemática das vias moleculares que ligam a resistência à insulina e Doença de Alzheimer (DA)

Representação esquemática das vias moleculares que ligam a resistência à insulina e doença de Alzheimer.

Fonte: adaptado de Sung (2011).

1.7 MODELO ANIMAL DE DEMÊNCIA INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ)

O modelo de resistência cerebral à insulina via administração intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ) replica alguns achados bioquímicos em pacientes e em modelos animais de DA.

A STZ é uma glicosamina-nitrosureia comumente usada para produzir o diabetes. Esta droga é absorvida pelas células pancreáticas que contêm transportadores de glicose tipo 2 (GLUT-2), assim, as células produtoras de insulina que não expressam esse transportador são resistentes à STZ. Alguns mecanismos são propostos para a citotoxicidade produzida pela

STZ. Por outro lado, evidências indicam que os radicais livres podem ter um papel essencial no efeito diabetogênico da STZ (Silva et al., 2011).

A STZ é um composto de glucosamina que, quando metabolizado, gera um produto citotóxico que induz um dano direto nas células beta do pâncreas. A administração de STZ via ICV em ratos demonstrou induzir disfunção cognitiva, prejuízo na glicose intracerebral e metabolismo energético, aumento do estresse oxidativo, hiperfosforilação da proteína tau e outras alterações bioquímicas semelhantes ao observado na doença de Alzheimer (Correia et al., 2011).

No geral, as semelhanças entre a doença de Alzheimer em humanos e o modelo experimental utilizando da administração de STZ via ICV são óbvias: 1) induz alterações bioquímicas, caracterizadas por diminuição da glicose cerebral e do metabolismo energético, redução do fluxo sanguíneo cerebral, estresse oxidativo e disfunção colinérgica e 2) resulta em uma deterioração progressiva da aprendizagem e memória. Dito isto, o modelo animal icv STZ representa uma ferramenta experimental promissora, pois induz um estado cerebral resistente à insulina, o que é proposto como um modelo experimental adequado para a DA (Correia et al., 2011).

Além disto, a DA induzida por STZ é associada com a diminuição da capacidade de aprendizagem e o desempenho da memória (Sim, 2014).

1.8 NANOPARTÍCULAS DE OURO (GOLD NANOPARTICLES - GNP)

Um enorme avanço na geração e na elaboração de novos materiais tem ocorrido nos últimos anos dentro de uma recente fronteira chamada nanotecnologia (Katz e Willner, 2004). A nanotecnologia é claramente uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar, uma vez que se baseia nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais), estruturados em escala nanométrica – nanoestruturados de modo a formar blocos de construção (building blocks) como clusters, nanopartículas, nanotubos e nanofibrilas, que por sua vez são formados a partir de átomos ou moléculas. A síntese e o controle dos materiais em escala nanométrica antecipam a fabricação e o controle da estrutura da matéria num nível molecular e representa o início de uma nova e revolucionária era, onde se pode ter acesso a novas propriedades e comportamentos de materiais e dispositivos, de modo nunca visto (Duran, 2006).

Durante as últimas décadas, as nanopartículas inorgânicas cujas estruturas exibem funcionalidade e propriedades biológicas devido ao seu tamanho, tem despertado muito interesse de diferentes grupos e áreas de pesquisa (Bhattacharya e Mukherjee, 2008). Dentre elas, destacam-se as nanopartículas de ouro (GNP), que recebem atenção especial devido às propriedades ópticas, eletrônicas, redox e catalítica (Daniel e Astruc, 2004). A atividade antitumoral da cisplatina, descoberta em 1969 incitou a investigação desta atividade em outros metais, inclusive o ouro. Estimulando à blindagem de muitas fosfinas que contém drogas a base de ouro, particularmente o complexo bisdisphofo Ouro. Este complexo mostrou propriedades antitumorais promissoras, porém exibiu toxicidade cardiovascular, o que impediu seu uso clínico (Berners-Price et al., 1987).

As GNP são utilizadas para o tratamento de várias doenças inflamatórias e outras desordens relativas devido as suas propriedades biológicas, ópticas e químicas. A utilização das nanopartículas no tratamento de diversas doenças e outras desordens relativas surge devido as evidências do efeito antioxidante do ouro no tratamento tradicional das doenças (Karthick et al., 2014).

Além disto, as GNP possuem um efeito no sistema antioxidante, onde a glutatona (GSH) é um redutor livre do grupo funcional tiol, responsável pela desintoxicação dos peróxidos, tais como o peróxido de hidrogênio, atuando como um importante antioxidante das células. No processo de desintoxicação GSH (forma reduzida) a glutatona fica oxidada. Os níveis aumentados de ERO em indivíduos com Diabetes pode ser devido à sua maior produção e/ou diminuída da destruição por antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), GSH, catalase e glutatona peroxidase (GPX) (BarathManiKanth et al., 2010). Existe na literatura diversos estudos em modelo animal de resistência periférica à insulina e desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2, na qual tais efeitos foram revertidos após a administração de GNP. No estudo de Barathmanikanth et al., (2010) no modelo tratado com GNP houve uma redução significativa da glicemia e perfil lipídico em comparação com o grupo sem tratamento.

Com relação à aplicabilidade da GNP no SNC ainda carecem de estudos, porém devido às propriedades anti-angiogênicas, antioxidantes e anti-inflamatórias das GNP, sua aplicação pode diminuir os efeitos deletérios do modelo de resistência cerebral à insulina.

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao envelhecimento populacional as doenças crônicas degenerativas se tornaram cada vez mais prevalentes ocasionando sério problema de saúde pública. Dentre as doenças mais prevalentes durante o processo de envelhecimento destacam-se as demências, cuja incidência duplica a cada cinco anos a partir dos 65 anos de idade, passando de 2% aos 65 anos para próximo de 50% aos 90 anos de idade.

A DA é a demência com maior prevalência, porém sua etiopatogenia ainda não está totalmente esclarecida e a terapêutica atual além de ser de alto custo apresenta uma resposta pífia no início do quadro e não altera a progressão natural da doença. Atualmente alguns estudos sugerem que respostas inflamatórias, estresse oxidativo e a resistência à sinalização da insulina no SNC aparentemente estão relacionadas com diversas doenças neurodegenerativas, principalmente a DA. Além disso, sabe-se que a insulina exerce um grande efeito no cérebro tanto regulando o metabolismo como auxiliando como um fator neuromodulador de processos cognitivos. Portanto, fármacos que atuem nestas vias podem exercer um papel importante na terapêutica destas doenças. Nesse sentido, a GNP que apresenta comprovada ação anti-inflamatória e antioxidante e que em estudos animais foi capaz de melhorar os parâmetros de resistência periférica à insulina em modelo de DM2 induzida pela STZ, poderá, a nível de SNC, mimetizar tais resultados. Contudo, atualmente não existe na literatura estudos para determinar tais efeitos, porém devido às propriedades anti-angiogênicas, antioxidantes e anti-inflamatórias das GNP, sua aplicação pode diminuir os efeitos deletérios do modelo de resistência cerebral à insulina.

Assim, com os resultados desta pesquisa pretende-se contribuir com a comunidade científica no que diz respeito à novas perspectivas para intervenções terapêuticas nas demências.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração crônica de GNP sobre parâmetros moleculares e bioquímicos de tecido cerebral, muscular e hepático após injeção intracerebroventricular (ICV) de STZ em cérebro de ratos jovens.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de GNP presentes no tecido cerebral, hepático e muscular de ratos após sua administração crônica por 21 dias;
- Analisar os efeitos da administração crônica de GNP na taxa de mortalidade de ratos submetidos à um modelo de demência por 21 dias;
- Avaliar os possíveis efeitos regulatórios da administração crônica de GNP sobre os níveis de NF- κ B e IL-1 β em cérebro total de ratos submetidos à um modelo de demência;
- Avaliar os possíveis efeitos regulatórios da administração crônica de GNP sobre a produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e danos oxidativos em cérebro total de ratos submetidos à um modelo de demência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 QUESTÕES ÉTICAS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios e os procedimentos descritos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo nº 69/2014-1 (Anexo 1).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 86 ratos Wistar (60 dias, pesando entre 200 – 250 g) obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram mantidos em gaiolas isoladas com ventilação, controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (60 – 80%) em ciclo de 12 horas claro-escuro, alimentados com dieta padrão para roedores e água ad libitum. Cada grupo teve um *n* diferente devido a disponibilidade de animais para análise da mortalidade e um *n* fixo de 6 animais para as análises moleculares e bioquímicas.

Os animais foram distribuídos randomicamente em 6 grupos experimentais:

Grupo 1 – Sham (*n*=14)

Grupo 2 - Administração de STZ (*n*=14)

Grupo 3 - Administração de STZ + GNP 24h (*n*=15)

Grupo 4 – Administração de STZ + GNP 48h (*n*=15)

Grupo 5 - Sham + GNP 24h (*n*=14)

Grupo 6 – Sham + GNP 48h (*n*=14)

No primeiro dia do estudo os grupos 1, 5 e 6 receberam líquido artificial por injeção ICV e os grupos 2,3,e 4 receberam STZ por injeção ICV.

Após 24h os grupos 3 e 5 receberam GNP por injeção IP diariamente até o 21º dia e os grupos 4 e 6 receberam GNP por injeção IP com intervalo de 48h (dias alternados) até o 21º dia.

Após 21 dias (24h após a última administração de GNP), todos os grupos foram sacrificados por eutanásia e cirurgia estereotáxica.

4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE OURO (GNP)

GNP de tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich e colaboradores (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) (Nuclear, SP, Brasil). O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor. Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de HAuCl₄ foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 90 °C e sob agitação a 700 rpm. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando a 200 rpm durante 20 minutos. As soluções adquirem as colorações correspondentes a cada tamanho de GNP sintetizadas apresentando um pH de 5,8. Por conseguinte, o pH foi ajustado a pH fisiológico com solução tampão e, posteriormente, centrifugadas (13.000 rpm por 15 min), lavadas duas vezes com água ultrapura e, finalmente, disperso em solução salina onde a concentração da solução também foi ajustada.

Após a síntese, as soluções de GNP foram caracterizadas empregando-se a técnica de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), usando um espectrofotômetro modelo UV-1800, difração de raios-x, através do equipamento de LAB-X, modelo XDR – 6000 (Shimadzu). Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de SRP, foi realizada a temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL de cada uma das soluções, sendo que o espectro eletrônico das soluções foi monitorado diariamente ao longo de uma semana no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção, obtendo-se valor de 532 nm para GNP de 20 nm.

Para medidas de difratometria de raios-x (DRX), uma alíquota de 9 mL da solução de GNP foi centrifugada a 10.000 rotações por minuto por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o material sedimentado transferido para uma porta amostra e seco em estufa. O material foi caracterizado com os seguintes parâmetros: Comprimento de onda da radiação do tubo de cobre: 1.54056 Å, voltagem de 30 kV, corrente 30 mA. Velocidade de varredura: 2°/min, ao passo de 0.02°, entre 20-80° (Balasubramanian et al., 2010). O diâmetro médio das GNP foi calculado usando a equação de Scherrer $2\theta = 38^\circ$ (Yan et al., 2005).

Onde, D é Diâmetro médio, K = 0,94, uma constante característica das partículas esféricas, λ é comprimento onda (raios-x usado): 1,54056, β : Largura da banda a meia altura (total na metade máxima do pico em

radianos) e θ : Ângulo de Bragg (do pico de 100% de intensidade) (Balasubramanian et al., 2010).

A concentração de ouro foi mensurado por espectrofotometria de absorção atômica (Varian model AA 240Z; Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) obtendo concentração de 2,5 mg/L. A análise do Potencial Zeta, (ZetaPALS; Brookhaven Instruments, Nova Iorque, EUA) foi utilizado para medir os potenciais Zeta das GNP. A temperatura foi mantida a 25 °C. A concentração de ouro nas soluções de GNP foi determinada por espectrometria de absorção atômica (EAA) utilizando um espectrofotômetro modelo AA240 FS-FAST SEQUENTIAL ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETER marca VARIAN. Após todos os testes de caracterização foi observado que as GNP estavam adequadas para o uso.

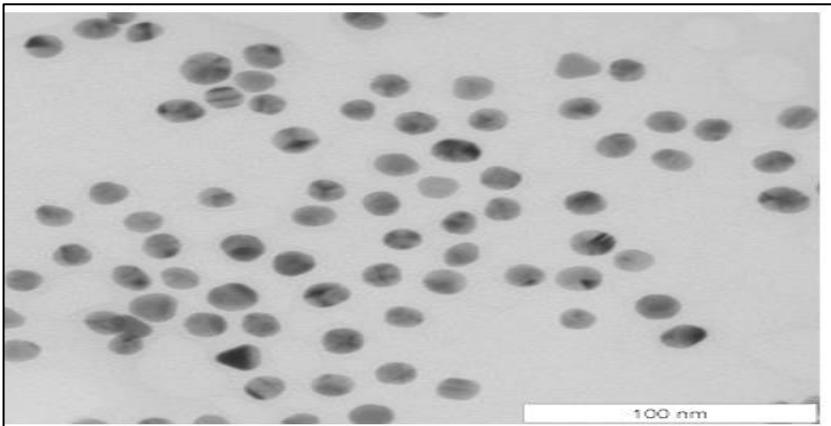


Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro (GNP) com diâmetro de 20 nm

Microscopia eletrônica de transmissão de GNP com diâmetro de 20 nm. Nanopartículas de ouro esféricas preparadas em solução aquosa. A barra de escala equivale a 100 nm.

Fonte: adaptado de Conde et al. (2013)

4.4 INDUÇÃO DO MODELO DE DEMÊNCIA E TRATAMENTO

Os animais foram anestesiados com injeção IP de cetamina 80 mg/kg e de xilazina e 20 mg/kg e logo após foi realizado injeções ICV bilaterais de STZ ântero-posterior (0.8 mm), médio-lateral (1,0 mm) e dorso-ventral (3mm) por cirurgia estereotáxica. Neste momento foi

injetado 2 µl de STZ 3mg/kg. Nos animais Sham foram injetadas a mesma quantidade de líquido artificial.

O tratamento com GNP foi iniciado 24 horas após administração de STZ por via IP e os ratos receberam uma dose de 2,5 mg/L com tamanho de partícula de 20 nm. A frequência de administração de GNP foi a intervalos de 24 e 48 horas até o vigésimo primeiro dia após a cirurgia estereotáxica. Utilizamos esta frequência de administração e o tamanho da GNP baseados em estudos que apresentaram melhores (Ashwani et al., 2013; Barathmanikanth et al., 2010; Ma et al., 2010).

4.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE OURO NOS TECIDOS

Os órgãos foram pesados (em papel alumínio – balança de precisão) e transferidos separadamente para os béqueres (de 50 ml) previamente identificados. Em seguida adicionou-se 10 ml de HNO₃ (65%) em cada um dos béqueres, e o sistema foi aquecido com auxílio da chapa de aquecimento por aproximadamente 10 minutos. Passado esse tempo adicionou-se 10 ml de HCL (100%) mantendo-se o aquecimento por mais 15 minutos. Passado este tempo, a solução passou de turva para amarelo límpido; então adicionou-se água ultra pura em cada uma das soluções e o sistema permaneceu em aquecimento constante com adição periódica de água ultra pura por 30 minutos. Desligou-se o aquecimento, esperou-se o sistema esfriar. Foi observado a existência de sobrenadante oleoso, então, repetiu-se a adição de ácidos (10 ml de HNO₃ e 10 ml de HCL) com o sistema em aquecimento por mais 30 minutos.

Concluído a digestão, o sistema de aquecimento foi desligado, esperou-se a solução esfriar. Na sequência as soluções foram transferidas separadamente para balões volumétricos de 25mL previamente identificado. A solução foi avolumada para 25 ml (0,25L) com água ultra pura. As soluções foram analisadas por espectrometria de massa.

4.6 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DO TECIDO

Vinte e quatro horas após a última administração de GNP os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20mg/kg) e submetidos a eutanásia por decapitação com guilhotina. O cérebro total foi cirurgicamente removido e imediatamente processado e armazenado para posterior análise em até 30 dias após o armazenamento. O cérebro de 6 animais

foi dividido em 3 partes. A primeira foi processada em tampão específico para dosagem imediata de superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e 2',7' diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA). A segunda parte foi alíquotada e armazenada em freezer – 70°C para análises dos parâmetros de estresse oxidativo. E a terceira parte do tecido foi homogeneizada em tampão contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 10mM de vanadato de sódio, 2mM de fenil metil sulfonil fluorido (PMSF) e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado a 11000 rpm por 40 minutos. No sobrenadante foi determinado a concentração de proteína utilizando o método de Lowry (1951) e posteriormente foi realizada a determinação do conteúdo proteico com anticorpo específico por Western blotting.

4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.7.1 Produção de Peróxido de Hidrogênio

O cérebro total foi dissecado e homogeneizado em tampão de isolamento (0,32 M sacarose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado 4.000 rpm (3min). O homogeneizado foi incubado em tampão de respiração (10 mM Tris HCl, pH 7,4, 0,32 M manitol, 8 mM fosfato de sódio, 4 mM MgCl₂, 0,08 mM EDTA e 0,2 mg/mL de albumina bovina livre de ácidos graxos) com adição 10 mM Amplex Red para determinação específica de H₂O₂ por fluorescência (comprimento de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão, leitor de microplaca Spectra Max M5) (Molecular Devices).

4.7.2 Ânion Superóxido

A produção de superóxidos foi determinado pela oxidação da adrenalina em tampão contendo partículas sub-mitocondriais (SMP), succinato (inibidor da cadeia de transferência de elétrons) e catalase. Um controle negativo é determinado com a presença de superóxido dismutase (SOD) (Poderoso et al., 1996).

4.7.3 Diclorofluoresceína - DCFH-DA

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) a partir da

oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ROS de acordo com o método descrito anteriormente Lebeland Bondy (1992), com algumas modificações.

4.7.4 Indicador da Formação de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabolito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1 % sulfanilamida e 0,1 % de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabolito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram calculados em µmol Nitrito/mg proteína (Chaea et al., 2004).

4.7.5 Conteúdo de Proteínas Oxidadas

Determinado a partir do conteúdo total de tióis na presença beta distrobrevina (DTNB) e lido espectrofotometricamente a 412nm (Aksenov e Markesbery, 2000).

4.7.6 Carbonilação de Proteínas

A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine e colaboradores (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de 22.000 M⁻¹ cm⁻¹.

4.7.7 Superóxido Dismutase (SOD)

Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (1987). As amostras de cérebro total foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15µl foram retiradas da mesma, a qual 5 ml de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175-185mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5µl adrenalina (60mM em água destilada +15ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras

foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

4.7.8 Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPX)

A determinação da atividade da GPX foi realizada a partir da taxa de decaimento da adenosina nicotinamina fosfato oxidase (NADPH). A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm, conforme Flohé e Günzler (1984). Os resultados foram calculados como U/ mg de proteína, sendo que 1U corresponde a 1 μ mol de peróxido transformado em água por minuto.

4.7.9 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio lido em espectrofotômetro a 240 nm, segundo Aebi (1984).

4.7.10 Glutaciona (GSH)

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado em homogenato de cerebro total após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 μ M DTNB. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutaciona reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras.

4.7.11 Conteúdo de Proteínas

O teor de proteína a partir de tecido cerebral homogenizado foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry (1951). Reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado para ligar-se à proteína. O reagente foi lentamente reduzido, passando de amarelo para azul. Absorbância foi lida a 750nm.

4.8 WESTERN BLOTTING

Alíquotas contendo 250 mg de proteína (por amostra) foram aplicadas em 1,5mm de espessura em gel de poliacrilamida. Eletroforese foi conduzida em uma célula mini gel (BioRad, Mini-Protean), com tampão de eletroforese previamente diluída. SDS-PAGE foi inicialmente conduzida a 25V (sobre o gel de empilhamento) e 120V (até o final do gel de resolução). Em seguida, as proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um dispositivo mini gel electrotransference (BioRad) e da solução tampão de corrida foi mantido em 120V por 2 h sob refrigeração contínua com gelo. Membranas de nitrocelulose contendo as proteínas de execução foram incubadas em solução bloqueadora por 2 h em temperatura ambiente para reduzir a ligação de proteínas não específicas. Então, as membranas foram lavadas três vezes (10 min de cada vez) em solução tampão e incubadas em anticorpos específicos (anti-NF- κ B e anti-IL-1 β) sob constante agitação durante a noite a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente três vezes (10 min de cada vez) em solução tampão e incubadas em anticorpo secundário conjugado com peróxido por 2h em temperatura ambiente. O excesso de anticorpo secundário foi lavado com tampão de lavagem e, em seguida, as membranas foram incubadas em substrato enzimático por 2 min e expostos a um X-ray do filme (Kodak XAR, Rochester, NY) com intensificador (Cronex relâmpagoPlus, DuPont, Wilmington, DE) em um cassete de radiografia. Intensidade da banda foi determinada por radiografias de leitura desenvolvido pela densitometria óptica usando um scanner (HP3400) e da Scion software de imagem (Scion Corporation).

4.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados bioquímicos e moleculares foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16.0 como pacote estatístico. Nos dados de probabilidade de sobrevivência cumulativa foi traçado em uma curva de Kaplan-Meier com pares de comparações de mortes utilizando a análise estatística log-rank. Em relação à produção de peróxido de hidrogênio (Figura 8D) os dados foram analisados com o teste t de student para amostras pareadas e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÕES TECIDUAIS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

A tabela 1 demonstra a concentração de GNP no cérebro, fígado e músculo dos animais de todos os grupos experimentais ($n=3$). Podemos observar que os animais do grupo Sham e STZ não apresentaram nenhuma concentração de GNP nos tecidos, entretanto os grupos que receberam tratamento com GNP em intervalos de 24 e 48 horas via IP por 21 dias demonstram a presença de GNP em concentrações similares nos grupos e tecidos utilizados, porém concentrações de GNP no cérebro foram maiores nos grupos que receberam STZ.

Tabela 1 - Concentração de nanopartículas de ouro no cérebro, fígado e músculo de ratos após modelo de demência e tratados por 21 dias com nanopartícula de ouro via intraperitoneal em intervalos de 24 e 48 horas.

Concentração (%) de nanopartículas de ouro			
Grupos	Cérebro	Fígado	Músculo
Sham	0%	0%	0%
STZ	0%	0%	0%
STZ + GNP 24h	0,044%	0,025%	0,020%
Sham + GNP 24 h	0,012%	0,027%	0,027%
STZ + GNP 48h	0,025%	0,036%	0,036%
Sham + GNP 48 h	0,012%	0,028%	0,040%

Fonte: tabela elaborada pelo autor (2015).

5.2 MOLÉCULAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

A figura 7 apresenta os níveis proteicos de NF-Kb (Figura 7A) e de IL-1 β (Figura 2B). Observa-se que os níveis de NF-Kb tiveram um aumento estatisticamente significativo no grupo STZ e STZ + GNP 24h quando comparado ao grupo Sham ($p<0,01$). Entretanto, os demais grupos apresentaram uma redução estatisticamente significativa quando

comparado ao grupo STZ ($p < 0,01$). Quanto aos níveis de IL-1 β , houve um aumento estatisticamente significativo no grupo STZ quando comparado com o grupo Sham ($p < 0,01$). Já o grupo Sham + GNP 24hs e o grupo Sham + GNP 48hs tiveram uma redução estatisticamente significativa quando comparado com o grupo STZ ($p < 0,01$).

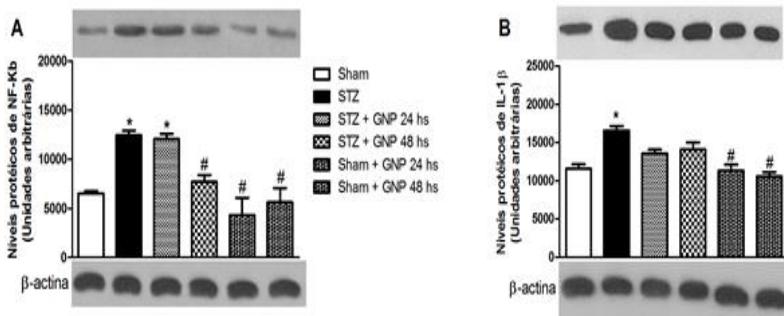


Figura 7 - Níveis proteicos de NF-kB (7A) e IL-1 β (7B)

Efeito da administração crônica de GNP sobre os níveis de NF-kB e IL-1 β em cérebro total de ratos submetidos à um modelo de demência;. * $P < 0,01$ vs. Grupo Sham, # $P < 0,01$ vs. Grupo STZ (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

Fonte: figura elaborada pelo autor (2015).

5.3 PRODUÇÃO DE OXIDANTES

Os níveis de superóxido nas partículas submitocondriais, oxidação de DCFH-DA, níveis de nitrito e produção de peróxido foram investigados como parâmetros oxidativos (Figuras 8A, 8B e 8C). Na figura 8A, avaliamos os níveis de superóxido e podemos observar um aumento estatisticamente significativo nos grupos STZ, STZ + GNP 24hs e STZ + GNP 48hs quando comparado com o grupo Sham ($p < 0,01$). Entretanto, os grupos Sham + GNP 24hs e Sham + GNP 48 hs quando comparados com o grupo STZ apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Em relação aos níveis de DCFH (Figura 8B) o grupo STZ apresentou um aumento estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle ($p < 0,01$), porém, os grupos STZ + GNP 48hs, Sham + GNP 24hs e Sham + GNP 48hs apresentaram uma redução estatisticamente significativa quando

comparado com o grupo STZ ($p < 0,01$). Na figura 8C, avaliamos os níveis de nitrito e podemos observar que o grupo STZ teve um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo Sham ($p < 0,01$) enquanto os grupos STZ + GNP 48hs, Sham + GNP 24hs e Sham + GNP 48hs uma diminuição significativa quando comparado com o grupo STZ ($p < 0,01$). Também avaliamos a produção de peróxido de hidrogênio (Figura 8D) e podemos observar que o grupo STZ teve um aumento significativo em relação ao grupo Sham somente quando utilizamos o Test t ($p < 0,05$).

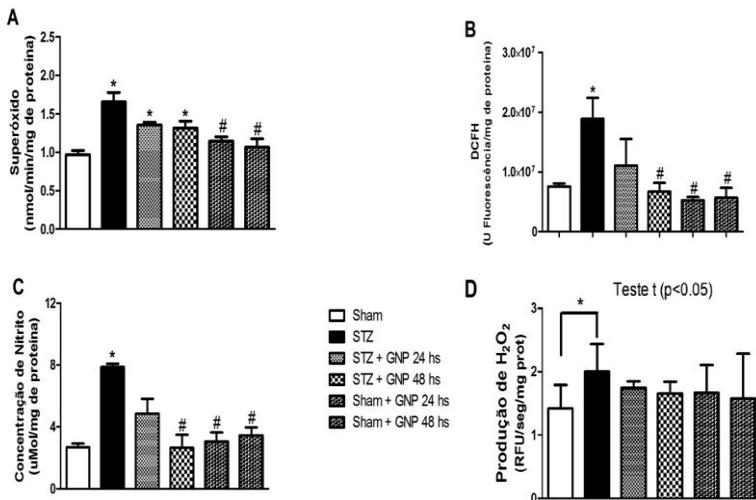


Figura 8 - Níveis de Superóxido (8A), oxidação de DCFH-DA (8B), níveis de nitrito (8C) e produção de peróxido de hidrogênio (8D)

Efeito da administração crônica de GNPs na produção de superóxido (A) no conteúdo de DCFH (B) na concentração de nitrito (C) e na produção de peróxido (D) em cérebro total de ratos submetidos à um modelo de demência. As barras representam a média ± erro padrão da média para seis animais. * $P < 0,01$ vs. Grupo Sham, # $P < 0,01$ vs. Grupo STZ (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey). Na figura 8D os dados foram analisados com o teste t de student (* $P < 0,05$ vs. Grupo Sham).

Fonte: figura elaborada pelo autor (2015).

5.4 DANOS OXIDATIVOS

O dano oxidativo foi analisado a partir dos níveis de carbonilação de proteínas e a oxidação dos grupos tióis. Como demonstrado na figura

9A, observamos um aumento estatisticamente significativo do grupo STZ comparado com o grupo Sham ($p < 0,01$). Entretanto, os demais grupos apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo STZ ($p < 0,01$). Na oxidação dos grupos tióis (Figura 9B), uma redução significativa foi observada no grupo STZ e STZ + GNP 24hs. Já os grupos STZ + GNP 48hs, SHam + GNP 24hs e Sham + GNP 48hs tiveram um aumento significativo nos tióis totais quando comparado ao grupo STZ ($p < 0,01$).

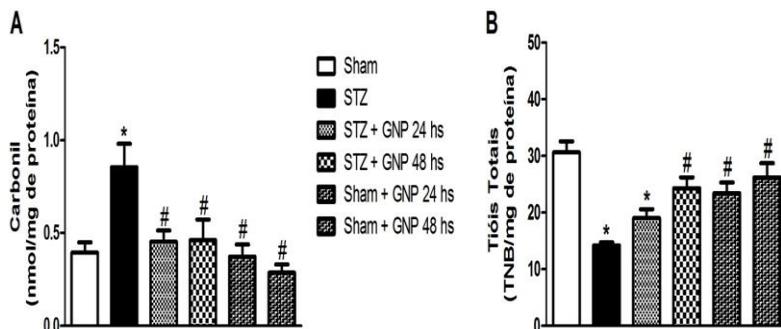


Figura 9 - Níveis de Carbonilação de Proteínas (9A) e oxidação de tióis (9B)

Efeito da administração crônica de GNP na carbonilação de proteínas (A) e no conteúdo de tióis totais (B) em cérebro total de ratos submetidos à um modelo de demência. As barras representam a média ± erro padrão da média para seis animais. * $P < 0,01$ vs. Grupo Sham, # $P < 0,01$ vs. Grupo STZ (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

Fonte: figura elaborada pelo autor (2015).

5.5 SISTEMA ANTIOXIDANTE

A atividade da enzima superóxido dismutase (Figura 10A), glutatona peroxidase (Figura 10B), catalase (Figura 10C) e os níveis totais de glutatona (Figura 10D), foram mensurados como parâmetros do sistema antioxidante.

A atividade da enzima superóxido dismutase no grupo STZ foi estatisticamente diminuída quando comparado ao grupo Sham ($p < 0,01$), porém os grupos SHam + GNP 24hs e Sham + GNP 48hs apresentaram um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao grupo STZ ($p < 0,01$). Em relação a atividade da glutatona peroxidase o grupo STZ e o grupo STZ + GNP 24hs tiveram uma redução estatisticamente

significativa quando comparado ao grupo Sham ($p < 0,01$). A atividade da catalase também demonstrou uma redução estatisticamente significativa no grupo STZ e no grupo STZ + GNP 24hs quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$) e um aumento estatisticamente significativo nos demais grupos quando comparado ao grupo STZ ($p < 0,01$). Nos níveis de glutathiona total os grupos STZ e STZ + GNP 24hs tiveram uma redução estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$) e os demais grupos apresentaram um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao grupo STZ ($p < 0,01$).

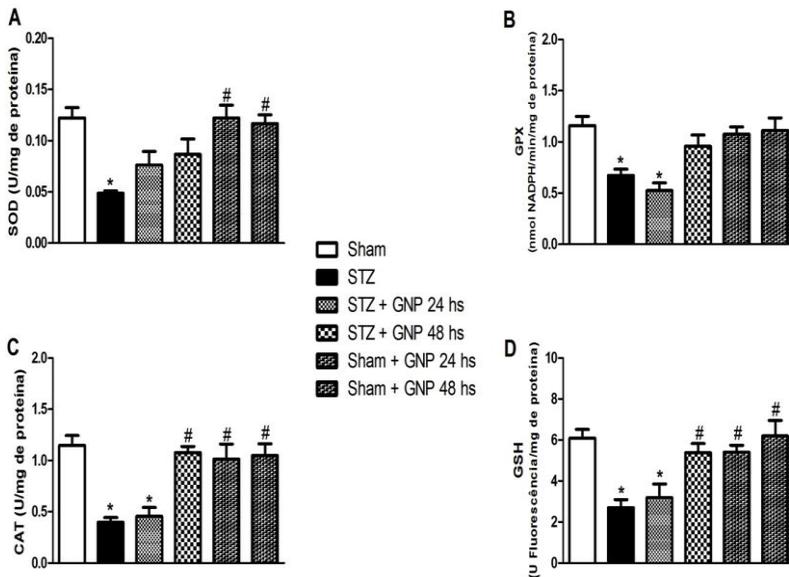


Figura 10 - Sistema antioxidante: superóxido dismutase - SOD (10A), glutathiona peroxidase - GPX (10B), catalase - CAT (10C) e Glutathiona - GSH (10D)

Efeito da administração crônica de GNP sobre a atividade da superóxido dismutase (A), glutathiona peroxidase (B), catalase (C) e sobre o conteúdo de GSH (D) em cérebro total de ratos submetidos à um modelo de demência. As barras representam a média \pm erro padrão da média para seis animais. * $P < 0,01$ vs. Grupo Sham, # $P < 0,01$ vs. Grupo STZ (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

Fonte: figura elaborada pelo autor (2015).

5.6 PORCENTUAIS DE SOBREVIVÊNCIA

A figura 11 demonstra que o grupos STZ e STZ + GNP 24 hs tiveram uma porcentual de sobrevida de 25 e 35% respectivamente sendo diferentes estatisticamente em relação ao grupo controle. Porém, o grupo STZ + GNP 48 hs apresentou uma sobrevida de 65 % sendo estatisticamente diferente do grupo STZ e STZ + GNP 24 horas ($p < 0,05$).

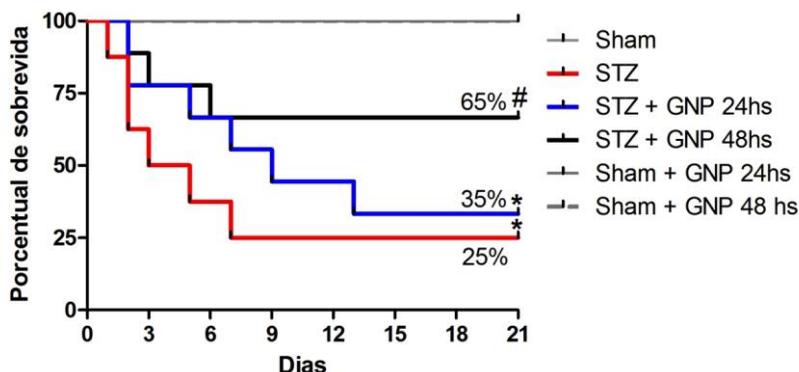


Figura 11 - Efeito da administração crônica de GNP sobre o percentual de sobrevida

Efeito da administração crônica de GNP por 21 dias sobre o percentual de sobrevida de ratos submetidos à um modelo de demência. * $P < 0,05$ vs. Grupo Sham, # $P < 0,05$ vs. Grupo STZ e STZ + GNP 48 hs (Curva de Kaplan-Meier com pares de comparações de mortes utilizando a análise estatística log-rank).

Fonte: figura elaborada pelo autor (2015).

6 DISCUSSÃO

Atualmente há um grande interesse em determinar a importância da sinalização da insulina na função cerebral normal e em uma condição de resistência central a insulina, e quanto isso pode estar relacionado com doenças neurodegenerativas e déficits cognitivos (de la Monte and Wands 2005; Fulop et al., 2003; Hoyer 2004a; Salkovic-Petrisic and Hoyer 2007). Vários estudos tem demonstrado que o comprometimento da via insulina/IGF1 pode causar uma disfunção mitocondrial com aumento no estresse oxidativo e consequentemente dano neuronal. Acredita-se que a resistência a insulina cerebral pode representar um papel chave na patogênese de doenças neurodegenerativas incluindo a DA (Dietrich et al., 2007; Lin and Beal 2006; Muller et al., 2008).

A STZ é comumente usada em altas doses (> 65 mg/kg, i.p.) para induzir diabetes mellitus em ratos, sendo administrada de forma periférica (Szkudelski 2001). Entretanto quando administrada ICV em baixas doses (1–3 mg/kg) não altera os níveis de glicose periféricos e é usada como um confiável modelo experimental para doença de Alzheimer esporádica de início tardio (Lannert and Hoyer 1998; Plaschke and Hoyer 1993; Prickaerts et al., 1999; Sharma and Gupta 2001). Devido a poucos estudos na literatura que demonstrem terapias efetivas no tratamento da DA, este trabalho teve como proposta avaliar os efeitos da administração crônica de GNP sobre parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo após injeção ICV de STZ em cérebro de ratos jovens.

Inicialmente, para validar nosso tratamento, foi analisado a concentração de GNP no cérebro, fígado e músculos dos animais que participaram do experimento. Como mostra a tabela 1 a concentração de GNP nas três estruturas foram similares entre os grupos tratados, porém a concentração de no cérebro foi maior no grupo que recebeu STZ. Provavelmente pelo tropismo da GNP à áreas onde apresente uma resposta inflamatória. Alguns estudos demonstram que a distribuição das GNP nos órgãos depende do tamanho e varia de acordo com a via de administração (Hillyer and Albrecht, 2001; Sonavane et al., 2008; De Jong et al., 2008; Semmler-Behnke et al., 2008; Hainfeld et al., 2006). Hyllier e Albertch (2001) mostraram que a administração de GNP IP distribui-se em vários órgãos e tecidos e que a quantidade da absorção e distribuição no organismo é inversamente proporcional com o tamanho da partícula. Na maioria dos trabalhos com administração crônica, o fígado e o baço são os órgãos que tem a maior absorção, entretanto,

outros órgãos como o pulmão, rim, músculo, coração e cérebro mostram um absorção menor (Kjellin, 1981; Cho et al., 2009; Longmire et al., 2008; Sadauskas et al., 2007).

Vários autores têm demonstrado que a administração de STZ (ICV) induz um modelo animal de demência do tipo Alzheimer, tipicamente produzindo uma diminuição no metabolismo energético cerebral e estresse oxidativo (Singh et al., 2012; Sodhi e Singh, 2013). Ocorre dano na bainha de mielina pelo estresse oxidativo e inibição da adenosina trifosfato (ATP) e na síntese de Acetil Co-A por STZ podendo levar a uma disfunção cognitiva (Hoyer, 2000; Ishrat et al., 2006). Além disso, também é postulado que a administração de STZ (ICV) causa uma neuroinflamação por aumentar a expressão de NF- κ B, citocinas pró-inflamatórias, BDNF, células gliais derivadas de fator neurotrófico e integrina-alfa-M (Sharma e Gupta, 2001; Grunblatt et al., 2006). Devido a essas alterações, foi dosado os níveis proteicos de NF- κ B e IL-1 β no cérebro de ratos após administração STZ (ICV) e os resultados mostram que houve uma aumento significativo na expressão dessas proteínas confirmando os achados na literatura. Porém, o grupo que recebeu tratamento com GNP por 21 dias com intervalo de 48 horas reduziu significativamente os níveis de NF- κ B e não alterou os níveis de IL-1 β . Em relação ao processo inflamatório, as GNP tem recebido uma grande atenção como um agente anti-inflamatório devido a sua habilidade de inibir a expressão de NF- κ B e consequentemente reduzir resposta inflamatória (Jeon et al., 2003; Norton, 2008).

As GNP bloqueiam a ativação de NF- κ B por interagir com o componente cys-179 do IKK- β inibindo sua ativação e assim diminuindo também a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (Jeon et al., 2003). Tsai et al., (2007) investigou o uso intra-articular de GNP em um modelo de artrite reumatoide induzida em ratos e observou uma inibição na proliferação e migração celular característico desse modelo, como também melhora no score histológico, densidade capilar, infiltração de macrófagos e expressão de NF- κ B, TNF- α e IL-1 β . Pedersen et al., (2009) avaliou os efeitos anti-inflamatórios das GNP com diâmetro de 20 e 45 nm na lesão cerebral focal. Os autores observaram que o tratamento significativamente reduziu os níveis de NF- κ B, IL-1 β e marcadores de pró-apoptóticos.

Células gliais são abundantemente presentes no cérebro e sua ativação, crescimento e diferenciação induzidas por administração de STZ (ICV) são implicadas na indução de uma neuroinflamação e essa resposta esta associada à patogênese das doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Meda et al., 2001; Alvarez et al., 2006;

Mrak e Griffin, 2001). Liu et al., (2003) sugere que essa ativação da microglia leva a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), provocando danos neuronais. Além disso, varias evidencias demonstram que a mitocôndria *per se* pode ser um local de dano na doença de Alzheimer. Sabe-se que a proteína A β é absorvida e interage com diversas proteínas mitocondriais levando a reduções na atividade da cadeia respiratória e aumento na produção de ERO, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Readnower et al., 2011). Outro mecanismo proposto para geração de ERO e ERN por STZ (ICV) é a lesão direta na membrana mitocondrial induzindo um influxo de cálcio que ativa proteases e fosfolipases que vão gerar um colapso no potencial de membrana mitocondrial. (Wang e Thayer, 2002; Gunjan et al., 2011; Duchon et al, 1999).

Neste contexto, foi avaliado a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, concentração de nitrito e níveis de DCFH após administração STZ (ICV) e tratamento com GNP por 21 dias. A figura 8 demonstra que o grupo que recebeu apenas STZ (ICV) demonstrou um aumento significativo em todos os parâmetros analisados, e isso corrobora com estudos anteriores que afirmam que esse modelo induz uma produção excessiva de ERO e ERN. Entretanto o grupo que recebeu tratamento com GNP com intervalo de 48 horas reduziu significativamente os níveis de DCFH e nitrito e não alterou a produção de peróxido de hidrogênio. Nosso resultado é suportado por estudos *in vitro* com várias linhagens celulares que mostram um potencial antioxidante contra a formação principalmente de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (Nie et al., 2007; Huang et al., 2005; Yakimovich et al., 2008; Junpingchen et al., 2006; Scampicchio et al., 2006; Ma et al., 2010; Ashwani et al., 2013; Pedersen et al., 2009).

Barathmanikanth et al., (2010) induziu um modelo de diabetes com STZ (IP) e mostrou que as GNP agiram como antioxidantes por inibir a formação de ERO e ERN e também como um quelante de radicais livres. Outra hipótese é que como as Nanopartículas inibem a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias isso acarretará em uma diminuição da formação de ERO e ERN (Kim et al., 2007). Li et al., (2012) mostrou que as GNP inibiram a síntese de óxido nítrico sintetase (NOS) e a produção de óxido nítrico induzidos por injeção ICV de lipopolissacarídeo (LPS).

Para entender melhor o mecanismo de defesa das GNP foi dosado a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (CAT) como também os níveis totais de glutathiona (GSH). Os resultados da figura 10 mostram que o

grupo STZ teve uma redução em todas as enzimas do sistema antioxidante. É possível que essa modulação bioquímica ocorra devido a uma resposta inflamatória e conseqüentemente um aumento na produção de ERO e ERN de forma crônica. A SOD tem um papel importante catalisando a dismutação de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, em seguida, a GPX e/ou CAT desempenham um papel importante na defesa contra estresse oxidativo por converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2007). São enzimas que tem sua atividade dependente das concentrações de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, e como observamos na figura 8, a produção dessas espécies foi muito elevada durante os 21 dias, portanto, a diminuição das atividades das enzimas antioxidantes pode estar relacionada com a dificuldade das células em restaurar os níveis normais pelo excesso de ERO e ERN.

A GSH é um dos antioxidantes não-enzimáticos mais importantes no tecido cerebral, basicamente, por reagir com uma variedade de radicais livres doando um átomo de hidrogênio e/ou servindo como um substrato para GPX para eliminar H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos, além de estar envolvida na redução de outros antioxidantes (Halliwell e Guteridge, 2007). Assim, a redução nos níveis de GSH total observada após administração de STZ (figura 10D) está associada com a produção excessiva de ERO, bem como pela capacidade reduzida do cérebro na ressíntese de glutathiona sob essas condições (Pompela et al., 2003).

Por outro lado o grupo que recebeu a administração de STZ (ICV) e foi tratado com GNP com intervalos de 48 horas (STZ + GNP 48h) apresentou um aumento significativo na atividade da CAT e nos níveis de GSH em comparação com o grupo STZ, e ainda não apresentou alterações na atividade da SOD e GPX em relação ao controle. Possivelmente, esses resultados podem estar relacionados com uma menor vulnerabilidade da célula a ataques de ERO e ERN. Alguns estudos que utilizaram GNP com diversos tamanhos e concentrações como tratamento de lesões teciduais mostraram que essa terapia tem capacidade de aumentar a atividade da SOD e GPX, porém, seu mecanismo exato ainda permanece desconhecido (Sul et al., 2007; Shah e Vohora, 2002; Matteo et al., 2006)

Por outro lado, o aumento da GSH total é uma importante resposta protetora dessa terapia. A glutathiona contém grupos tióis e atua como um agente redutor em células cerebrais para prevenir o dano oxidativo induzido por ERO (Halliwell e Gutteridge, 2007). Apesar da compreensão do papel da glutathiona nos sistemas biológicos, os efeitos observados não estão completamente esclarecidos e necessitam de mais

estudos. No entanto, a redução na produção de oxidantes pelo grupo que recebeu GNP em intervalos de 48h faz com que os níveis de glutathione permaneçam iguais aos níveis observados no grupo controle.

Radicais livres mediando peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e dano oxidativo em ácidos nucleicos são considerados eventos cruciais na ação citotóxica das ERO e ERN. Os grupos tióis e as proteínas presentes na estrutura celular são alvos comuns de ataques peroxidativos levando a alterações na permeabilidade e fluidez da membrana (Juraneck e Bezek, 2005). Assim, foram avaliados os níveis de carbonilação de proteínas e a oxidação dos grupos tióis no tecido cerebral total. Nossos resultados mostram que o grupo que recebeu somente STZ apresentou um aumento significativo nos níveis de carbonilação de proteínas e uma redução nos níveis de tióis totais e isso ocorreu provavelmente pelo aumento nos níveis de ERO e ERN já mostrado anteriormente.

Entretanto, o grupo que recebeu GNP com intervalos de tratamento de 48 horas induziu uma diminuição nos marcadores de dano oxidativo, isso provavelmente reflete a diminuição na produção de ERO e ERN induzida por essa terapia como visto na figura 8, que também foi demonstrado com a permanência nos níveis normais da atividade da SOD e GPX e um aumento significativo da atividade da CAT e nos níveis de GSH totais como mostra a figura 10.

Por último, foi analisado a percentual de sobrevivência dos grupos após exposição ao STZ (ICV) e/ou tratados com GNP (IP) com intervalos de 24 e 48 horas por 21 dias. Os resultados confirmam que o modelo de demência com STZ (ICV) é bastante agressivo apresentando uma taxa de sobrevivência de apenas 25 %. Nos grupos que receberam STZ (ICV) e GNP (IP) em intervalos de 24h (grupo 3) e 48h (grupo 4), o percentual de sobrevivência foi de 35 e 65% respectivamente. A significativa melhora na sobrevivência nos grupos tratados ratifica a eficácia da terapêutica, porém não sabe-se ainda o motivo pelo qual o esquema de administração de GNP em dias alternados foi superior ao esquema de administração diária.

7 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, concluiu-se que o modelo animal de DA induzido por STZ, induziu uma resposta inflamatória provavelmente pelo aumento significativo na produção de ERO e ERN e uma diminuição na atividade antioxidante. Nesse sentido, a terapia com GNP foi eficaz na redução da resposta inflamatória e no controle da produção excessiva de ERO e ERN por aumentar o potencial antioxidante cerebral. Além disso, esses efeitos protegeram contra a alta mortalidade induzida pela administração ICV de STZ.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos por este estudo apontam à GNP como um promissor tratamento da Doença de Alzheimer. Contudo, mais estudos devem ser direcionados para melhor compreensão do papel das GNP, bem como sua utilização em diferentes concentrações, diâmetros, tempos de tratamento e também em outros modelos animais de DA.

REFERÊNCIAS

Alvarez A, Cacabelos R, Sanpedro C, García-Fantini M, Aleixandre M. Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2007; 28(4):533-6.

American Psychiatric Association (APA) - Dementia. In: *DSM-IV*. 4^a ed. Washington. DC: American Psychiatric Association; 2000; pág. 147-71.

Ashwani Kumar Singh, Yamini B.Tripathi, Nidhi Pandey, D.P.Singh, Deepshikh Tripathi, O.N Srivastava. Enhanced anti lipopolysaccharide(LPS)induced changes in macrophage functions by *Rubia cordifolia* (RC) embedded with Au nanoparticles *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 65(2013):217–223.

Barathmanikant S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SR, Youn HS, Eom S, Gurunathan S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J Nanobiotechnology*. 2010; 8:16.

Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC; Dominantly Inherited Alzheimer Network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2012; 367(9):795-804.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 1998; 78(2):547-81.

Benarroch EE. Insulin-like growth factors in the brain and their potential clinical implications. *American Academy of Neurology*; 2012.

Berners-Price SJ, Sadler PJ. Interaction of the antitumor Au(I) complex [Au(Ph₂P (CH₂)₂PPH₂)₂]Cl with human blood plasma, red cells, and lipoproteins: 31P and 1H NMR studies. *J Inorg Biochem*. 1987; 31:267-281.

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

Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P, Camurri L, et al., Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995; 4:671-9.

Carvalho JAM, Garcia RA. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. *Cad Saude Publica.* 2003; 19(3):725-33.

Chen J, Patil S, Seal S, McGinnis JF. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat Nanotechnol.* 2006;1(2):142-50.

Conde J, Rosa J, Baptista PV Gold-Nanobeacons as a theranostic system for the detection and inhibition of specific genes..*Protocol Exchange* - Nature Publishing Group 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2881>>. Acesso em agosto de 2014.

Correia et al., Insulin-Resistant Brain State: the culprit in sporadic Alzheimer's Disease? *Ageing Res Rev.* 2011; 10(2):264–273.

Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties and applicationstoward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 2004; 104:293-346.

De Felice, Ferreira. Inflammation, Defective Insulin Signaling, and Mitochondrial Dysfunction as Common Molecular Denominators Connecting Type 2 Diabetes to Alzheimer Disease. *Diabetes.* 2014; 63:2262-2272.

De la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005; 7(1):45-61.

Dietrich MO, Muller A, Bolos M, Carro E, Perry ML, Portela LV, Souza DO, Torres-Aleman I. Western style diet impairs entrance of

blood-borne insulin-like growth factor-1 into the brain. *Neuromolecular Med.* 2007; 9(4):324-30.

Duarte AI, Moreira PI and Oliveira CR. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res.* 2012; 2012:384017.

Duarte AI, Proença T, Oliveira CR, Santos MS, Rego AC. Insulin restores metabolic function in cultured cortical neurons subjected to oxidative stress. *Diabetes.* 2006; 55(10):2863-70.

Duarte AI, Santos MS, Seça R, de Oliveira CR. Insulin affects synaptosomal GABA and glutamate transport under oxidative stress conditions. *Brain Res.* 2003; 977(1):23-30.

Duarte AI, Santos MS, Seça R, Oliveira CR. Oxidative stress affects synaptosomal gamma-aminobutyric acid and glutamate transport in diabetic rats: the role of insulin. *Diabetes.* 2004; 53(8):2110-6.

Duchen MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol.* 1999; 516(Pt 1):1-17.

Duran N, Mattoso LHC, Morais PC. *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.* 1ª ed. São Paulo: Artliber; 2006.

Fernandez AM, Torres-Alemán I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13(4):225-39.

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 Suppl):S76-S83.

Fulop T, Larbi A, Douziech N. Insulin receptor and ageing. *Pathol Biol (Paris).* 2003; 51(10):574-80.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology Medicine.* 4ª ed. New York: University Oxford; 2007.

Heuser VD, da Silva J, Moriske HJ, Dias JF, Yoneama ML, de Freitas TR. Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions

using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*. *Environ Mol Mutagen*. 2002; 40(4):227-35.

Heuser VD, de Andrade VM, Peres A, Gomes de Macedo Braga LM, Bogo Chies JA. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol Int*. 2008; 32(10):1223-9.

Hillyer JF, Albrecht RM. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2001; 90(12):1927-36.

Holanda ITA, Ponte KMDA, Pinheiro, MCD. Idosos com Alzheimer: um estudo descritivo. *Rev Rene*. 2012; 13(3): 582-89.

Hoyer S. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol*. 2004; 541:135-52.

Huang X, El-Sayed IH, Yi X, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: catalyst for the oxidation of NADH to NAD(+). *J Photochem Photobiol B*. 2005; 81(2):76-83.

Iarmarcovai G, Bonassi S, Sari-Minodier I, Baciuchka-Palmaro M, Botta A, Orsière T. Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. *Mutat Res*. 2007; 615(2):8-27.

Juránek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species--cause or consequence of tissue injury? *Gen Physiol Biophys*. 2005; 24(3):263-78.

Kanwar JR, Sun X, Punj V, Sriramoju B, Mohan RR, Zhou SF, Chauhan A, Kanwar RK. Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: untamed dragon with fire power to heal. *Nanomedicine*. 2012; 8(4):399-414.

Katz E, Willner. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004; 43(45):6042-108.

Kim NH, Lee MY, Park SJ, Choi JS, Oh MK, Kim IS. Auranofin blocks interleukin-6 signalling by inhibiting phosphorylation of JAK1 and STAT3. *Immunology*. 2007; 122(4):607-14.

Kogan MJ, Bastus NG, Amigo R, Grillo-Bosch D, Araya E, Turiel A, Labarta A, Giralt E, Puntès VF. Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation. *Nano Lett*. 2006; 6(1):110-5.

Kosik KS, Rapp PR, Raz N, Small SA, Sweatt JD, Tsai LH. Mechanisms of age-related cognitive change and targets for intervention: epigenetics. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012; 67(7):741-6.

Lannert H, Hoyer S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav Neurosci*. 1998; 112(5):1199-208.

Li C, Marshall CT, Lu C, Ding J, Wang H, Roisen FJ, Xiao M. The dynamic distribution of fluoro-gold and its interrelation with neural nitric oxide synthase following intracerebroventricular injection into rat brain. *Biotech Histochem*. 2006; 81(1):41-50.

Lima EP, Takada LT, Takahashi DY. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2004; 18(4):241-6.

Lin MT, Beal MF. Alzheimer's APP mangles mitochondria. *Nat Med*. 2006; 12(11):1241-3.

Liu YW, Sakaeda T, Takara K, Nakamura T, Ohmoto N, Komoto C, Kobayashi H, Yagami T, Okamura N, Okumura K. Effects of reactive oxygen species on cell proliferation and death in HeLa cells and its MDR1-overexpressing derivative cell line. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26(2):278-81.

Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, Song MD, Kang H, Kim DW, Moon WK, Lee KH. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide*. 2010; 23(3):214-9.

Mansour A, Hans EK. Cytotoxicity and mutagenicity of endogenous DNA base lesions as potential cause of human aging. *Mech Dev Aging*. 2008; 129(8):353-65.

McKee MD, Nanci A, Khan SR. Ultrastructural immunodetection of osteopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi. *J Bone Miner Res*. 1995; 10(12):1913-29.

Meda L, Baron P, Scarlato G. Glial activation in Alzheimer's disease: the role of Abeta and its associated proteins. *Neurobiol Aging*. 2001; 22(6):885-93.

Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1990; 65(3):375-98.

Mrak RE, Griffin WS. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001; 22(6):903-8.

Muller AP, Cammarota M, Dietrich MO, Rotta LN, Portela LV, Souza DO, Izquierdo I, Bevilaqua LR, Perry ML. Different effect of high fat diet and physical exercise in the hippocampal signaling. *Neurochem Res*. 2008; 33(5):880-5.

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

Nie Z, Liu KJ, Zhong CJ, Wang LF, Yang Y, Tian Q, Liu Y. Enhanced radical scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: a novel inspiration for development of new artificial antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(9):1243-54.

Nitrini R, Caramelli P, Herrera E Jr, Bahia VS, Caixeta LF, Radanovic M, Anghinah R, Charchat-Fichman H, Porto CS, Carthery MT, Hartmann AP, Huang N, Smid J, Partridge L, Gems D. Mechanisms of ageing: public or private? *Nat Rev Genet*. 2002; 3(3):165-75.

Nitrini R, Caramelli P, Herrera E Jr, et al. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2004; 18:241-246.

Paula VJR, Guimarães FM, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease: amyloid-beta, Tau protein or both?. *Dement Neuropsychol*. 2009; 3(3):188-194.

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

Plaschke K, Hoyer S. Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. *Int J Dev Neurosci*. 1993; 11(4):477-83.

Prickaerts J, Fahrig T, Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav Brain Res*. 1999; 102(1):73-88.

Readnower RD, Sauerbeck AD, Sullivan PG. Mitochondria, Amyloid β , and Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2011; (2011):04545.

Rege SD, Geetha T, Griffin GD, Broderick TL and Babu JR Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Front. Aging Neurosci*. 2014; 6:218. [doi: 10.3389/fnagi.2014.00218](https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00218)

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

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414(6865):799-806.

Scampicchio M, Wang J, Blasco AJ, Sanchez Arribas A, Mannino S, Escarpa A. Nanoparticle-based assays of antioxidant activity. *Anal Chem*. 2006; 78(6):2060-3.

Shah ZA, Vohora SB. Antioxidant/restorative effects of calcined gold preparations used in Indian systems of medicine against global and focal models of ischaemia. *Pharmacol Toxicol*. 2002; 90(5):254-9.

Sharma M, Gupta YK. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci*. 2001; 68(9):1021-9.

Shetty PK, Galeffi F, Turner DA. Age-Induced Alterations in Hippocampal Function and Metabolism. *Aging Dis*. 2011; 2(3):196-218.

Silva M, Lima WG, Silva ME, Pedrosa ML. Effect of streptozotocin on the glycemic and lipid profiles and oxidative stress in hamsters. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011; 55(1):46-53.

Singh AK, Tripathi YB, Pandey N, Singh DP, Tripathi D, Srivastava ON. Enhanced antilipopopolysaccharide (LPS) induced changes in macrophage functions by *Rubia cordifolia* (RC) embedded with Au nanoparticles. *Free Radic Biol Med*. 2013; 65:217-23.

Sim YJ. Treadmill exercise alleviates impairment of spatial learning ability through enhancing cell proliferation in the streptozotocin-induced Alzheimer's disease rats. *J Exerc Rehabil*. 2014; 10(2):81-88.

Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008; 66(2):274-80.

Stoppe JA. Aspectos clínicos da depressão em idosos. *Psiquiatria Clinica*. 1994; 21:121-128.

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

Sung MS, Hong JS, Inhee Mook-Jung. Insulin Resistance and Alzheimer's Disease, Topics in the Prevention, Treatment and Complications of Type 2 Diabetes. 2011; 978:590-7.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001; 50(6):537-46.

Teixeira INDO, Guariento ME. Biology of aging: theories, mechanisms, and perspectives. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2010; 15(6):2845-57.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1):44-84.

Veras R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. *Rev Saúde Pública*. 2009; 43(3):548-54.

Vinegar R, Traux JF, Selph JL. Some quantitative temporal characteristics of carrageenan-induced pleurisy in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1943; 143:711-714.

Wang GJ, Thayer SA. NMDA-induced calcium loads recycle across the mitochondrial inner membrane of hippocampal neurons in culture. *J Neurophysiol*. 2002; 87(2):740-9.

Weinert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* (1985). 2003; 95(4):1706-16.

Wiltfang J, Lewczuk P, Riederer P, Grünblatt E, Hock C, Scheltens P, Hampel H, Vanderstichele H, Iqbal K, Galasko D, Lannfelt L, Otto M, Esselmann H, Henkel AW, Kornhuber J, Blennow K. Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: the role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. *World J Biol Psychiatry*. 2005; 6(2):69-84.

Wojda A, Zietkiewicz E, Witt M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis*. 2007; 22(3):195-200.

Yakimovich NO, Ezhevskii AA, Guseinov DV, Smirnova LA, Gracheva TA, Klychkov KS. Antioxidant properties of gold nanoparticles studied by ESR spectroscopy. *Russian Chemical Bulletin* 2008; 57(3):520-523.

Zhou YT, He W, Wamer WG, Hu X, Wu X, Lo YM, Yin JJ. Enzyme-mimetic effects of gold@platinum nanorods on the antioxidant activity of ascorbic acid. *Nanoscale*. 2013; 5(4):1583-91.

ANEXO

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA



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

Resolução

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

Protocolo: 035-2014-02

Professor responsável: Paulo Cesar Lock Silveira

Equipe: Alexandre Pastoris Muller

Título: "Avaliação dos efeitos da administração crônica de nanopartículas de ouro sobre parâmetros comportamentais, moleculares e bioquímicos em modelo de demência em ratos".

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 60 Ratos Wistar, com 60 dias, pesando aproximadamente 250 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

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

Protocol number: 035-2014-02

Principal Investigator: Paulo Cesar Lock Silveira

Researchers: Alexandre Pastoris Muller

Project title: "Assessment of the effects of chronic administration of gold nanoparticles on behavioral, molecular and biochemical in dementia model in rats parameters."

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

Criciúma, 27 de agosto de 2014.

VILSON HEINZEN CARDOSO
Coordenador Adjunto da CEUA