

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

CARLOS ALBERTO DE CARVALHO

**EFEITO DO BUTIRATO DE SÓDIO NA MEMÓRIA,
MODULAÇÃO DAS HISTONAS DEACETILASES E DANO AO
DNA EM RATOS COM 2, 6 OU 16 MESES SUBMETIDOS AO
MODELO ANIMAL DE ENVELHECIMENTO INDUZIDO POR
D-GALACTOSE**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane Budni

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C331e Carvalho, Carlos Alberto de.
Efeito do butirato de sódio na memória, modulação das histonas deacetilases e dano ao DNA em ratos com 2, 6 ou 16 meses submetidos ao modelo animal de envelhecimento induzido por D-Galactose / Carlos Alberto de Carvalho. – 2017.
96 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Josiane Budni.

1. Butirato de sódio – Uso terapêutico. 2. Envelhecimento - Tratamento. 3. Dano ao DNA. 4. Modulação da histonas deacetilases. 5. Memória de habituação. 6. D-Galactose. 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 N° 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 Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Carlos Alberto de Carvalho** sob o título “EFEITO DO BUTIRATO DE SÓDIO NA MEMÓRIA, MODULAÇÃO DAS HISTONAS DEACETILASES E DANO AO DNA EM RATOS COM 2, 6 OU 16 MESES SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE ENVELHECIMENTO INDUZIDO POR D-GALACTOSE”, para obtenção do grau de DOUTOR 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 Tese.

Criciúma, SC, 31 de julho de 2017.

Prof.^a **Dr. MARIA INÊS DA ROSA**
Membro Relator – UNESC

Prof.^a **Dr. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO**
Membro Interno – UNESC

Prof.^a **Dr. LISIANE TUON GENEROSO BITENCOURT**
Membro Externo - UNESC

Prof.^a **Dr. GISLAINE TEZZA REZIN**
Membro Externo – UNISUL

Prof.^a **Dr. Josiane Budni**
Orientadora

Prof.^a **Dr. Maria Inês da Rosa**
Coordenadora do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurociências, Laboratório de Neurotoxicologia e Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

Aos meus amados pais, Ida Belolli de Carvalho e Nelzy José de Carvalho “*in memoriam*” que durante toda minha vida sempre me incentivaram para ser uma pessoa diferente, comprometida com a medicina. Foram fontes de inspiração e exemplos de dedicação.
Portanto, dedico este trabalho a eles.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora professora Dr^a. **Josiane Budni**, que me acolheu após o mestrado. Sou muito grato pelo grande apoio e direcionamento por todos os ensinamentos. Devo muito respeito e gratidão pela confiança e incentivo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação (PPGCS), que contribuíram preciosamente com minha formação nos ensinamentos dados durante esta jornada.

Aos colegas do Laboratório (Neurolab) **Michelle Lima Garcez**, **Tatiani Bellettini** e **Francielle Gonçalves Mina** que colaboraram de maneira sempre solícita, presente nos experimentos, e que enriqueceram grandiosamente o trabalho. A vocês agradeço os ensinamentos, pela paciência e compreensão.

As alunas de IC Franciellen Gonçalves Carneiro, Aline Pereira da Luz, Gustavo Luis Schiavo cujas mãos prestaram grande ajuda, em especial no cuidado com os animais.

A todos do Neurolab pelo companheirismo e pelas diversas demonstrações de amizade, demonstrando serem pessoas especiais e dedicadas.

A minha família, que é o tesouro mais valioso, razão do meu trabalho e incentivo, em especial meus filhos Alexia, Mateus e Letícia e minha querida esposa Fabiana, companheira sempre presente.

RESUMO

O envelhecimento é um processo biológico complexo, e o conhecimento deste ainda é limitado. Tem sido proposto que alterações epigenéticas podem estar relacionadas ao envelhecimento e ao declínio de memória. Dentre essas alterações está a acetilação de histonas que podem desempenhar um papel crucial no envelhecimento. Com isso, o presente estudo teve como objetivo padronizar o modelo animal de D-gal e avaliar o efeito do butirato de sódio (BS), um inibidor das histonas deacetilases, na memória, modulação das histonas deacetilases (HDAC) e dano ao DNA em ratos Wistar com 2, 6 ou 16 meses submetidos à administração de D-galactose (D-gal). Foram utilizados ratos Wistar machos com 2, 6 ou 16 meses de idade. Para estabelecer a melhor dose de D-gal para indução do modelo de envelhecimento foi realizada uma curva dose-resposta (100, 200 ou 300 mg/kg) em que a D-gal foi administrada durante 30 dias por via oral em ratos com 2 meses de idade. Após, ratos de diferentes idades (2, 6 e 16 meses) foram administrados com D-gal (200 mg/kg) ou água, durante 30 dias. No 24º dia iniciou-se, juntamente com a D-Gal, o tratamento com BS (600 mg/kg) por via intraperitoneal durante 7 dias. 24 horas após a última administração de D-gal ou BS foi realizado o teste de habituação ao campo aberto, Y-maze e esQUIVA inibitória. O BS foi capaz de reverter o dano de memória de habituação causado pela D-gal em animais com 2 e 6 meses, mas não com 16 meses. BS também foi capaz de reverter o dano causado pelo envelhecimento natural em animais com 16 meses. No teste de esQUIVA inibitória o BS melhorou a memória imediata, de curta e de longa duração de animais com 2 meses; a memória imediata de animais com 6 meses e a memória de curta e de longa duração de animais com 16 meses. Adicionalmente, o BS reverteu o dano na memória imediata e de curta duração causado pelo envelhecimento natural em animais com 16 meses. O dano na memória espacial causado pelo envelhecimento natural e pela D-gal não foi revertido pelo BS. Além disso, a D-gal causou aumento na atividade das HDACs em animais com 16 meses e o BS conseguiu reverter parcialmente esse efeito no córtex frontal e hipocampo. Quando avaliado os danos ao DNA no sangue periférico, utilizando o ensaio cometa, foi observado que o envelhecimento natural (animais com 16 meses) causou aumento da frequência de danos ao DNA, e o BS foi capaz de reverter parcialmente este dano. Além disso, a D-gal causou aumento do índice e frequência de danos ao DNA nos animais de 2 e 6 meses de idade, e o tratamento com BS foi capaz de reverter este dano, mas não o dano na

frequência em animais com 6 meses. Assim, o presente estudo mostrou o efeito protetor do BS na memória de ratos envelhecidos naturalmente ou induzidos pela administração oral de D-gal. A melhora da memória aversiva causada pelo BS nos animais de 16 meses tratados com D-gal pode ser explicada em parte pela redução da atividade das HDACs. A proteção do BS contra o dano na memória de habituação e aversiva induzida pelo envelhecimento natural pode ser explicado, parcialmente, pela redução da frequência de dano ao DNA. A reversão dos danos nas memórias de habituação e aversiva em animais com 2 e 6 meses tratados com D-gal pode ser explicado pela redução da frequência e índice de dano ao DNA nos animais de 2 meses e pela redução do índice de dano ao DNA nos animais de 6 meses. Portanto, o presente estudo fez novos achados que abrem caminho para a utilização do BS no envelhecimento.

Palavras-chave: butirato de sódio; dano ao DNA; D-galactose; envelhecimento; histonas deacetilases.

ABSTRACT

Aging is a complex biological process. The knowledge about it is still limited. Epigenetic alterations have been related to the aging and memory decline. Among these alterations there is the histone acetylation, which may play a crucial role in aging. Then, the aim of the present study was to standardize the animal model of D-gal and to evaluate the effect of sodium butyrate (SB), a histone deacetylase inhibitor, on memory, modulating deacetylase histone (DACH), and DNA damage in 2, 6 or 16 months-old Wistar rats and subjected to D-galactose (D-gal) administration. Male Wistar 2, 6 or 16 months-old rats were used. To choose the better dose of D-gal for induction of aging model was performed a dose-response curve (100, 200 or 300 mg/kg). D-gal was administered for 30 days by oral route in 2 months-old rats. After, 2, 6 or 16 months-old rats were administered with D-gal (200 mg/k) or water for 30 days. In the 24th day was started the treatment with SB (600 mg / kg) intraperitoneally for 7 days. 24 hours after the last D-gal or BS administration was performed the open field habituation, Y-maze and inhibitory avoidance test. SB was able to reverse the habituation memory damage caused by D-gal in 2 and 6 months-old animals, but not in 16 months-old animals. Also, SB was able to reverse the damage causes by natural aging in 16 months-old animals. In the inhibitory avoidance task, SB improved the damage causes by D-gal in the immediate, short-term and long-term memory of 2 months-old rats; immediate memory of 6 months-old animal and short-term and long-term memory of 16 months-old rats. Additionally, SB reversed the damage in the immediate and short-term memory cause natural aging in 16 months-old animals. The spatial memory damage causes by natural aging and D-gal not was reverse by SB. Moreover, D-gal caused an increase of the HDACs activity in 16 months-old animals and BS was able to partially reverse this effect in frontal cortex and hippocampus. When evaluated the DNA damage in the peripheral blood using the comet assay, it was observed that natural aging (16 months-old animals) caused an increase of the DNA damage frequency, and SB was able to reverse, partially, this effect. Moreover, D-gal caused an increase in the index and frequency of DNA damage in 2 and 6 months-old animals, and SB treatment was able to prevent this damage, but not the frequency damage in 6 months-old animals. Thus, the present study showed the protective effect of SB on memory of naturally aged or D-gal-induced rats by oral administration. The aversive memory improvement caused by SB in 16 months-old animals and D-gal-

induced aged can be explained, at least in part, by the reduction of HDAC activity. The protection of SB against damage on habituation and aversive memory induced by natural aging can be explain partially by reduction of DNA damage frequency. The reversal of damage in habituation and aversive memory in 2 and 6 months-old animals treated with D-gal can be explained by the reduction in frequency and index of DNA damage in 2 months-old animals and by the reduction of the DNA damage index in 6 months-old animals. Therefore, the present study made new findings that paved the way for the use of BS in aging.

Key-words: aging; DNA damage; D-galactose; histone deacetylases; sodium butyrate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG - 8-hidroxi-2-desoxiguanosina
AGES - Produtos finais de glicação avançada
ARC - Proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade
BDNF - Fator neurotróficos derivado do cérebro
BS - Butirato de sódio
CAMKII - Proteína cinase dependente cálcio/calmodulina
CCL2 - Quimiocina quimioatraente para monócitos
CLP - Perfuração e ligação cecal
CREB - Proteína de ligação ao elemento de resposta da adenosina monofosfato
DA - Doença de Alzheimer
D-GAL - D-galactose
DMSO - Dimetilsulfóxido
EDTA - Ácido etilenodiaminotetra acético
EGR1 - Proteína de resposta de crescimento precoce
EROS - Espécies reativas de oxigênio
FD - Frequência de danos
H3K14 - Histona metiltransferase específica para lisina 14 da histona 3
H3K9 - Histona metiltransferase específica para lisina 9 da histona 3
HAT - Histona acetiltransferase
HDAC - Histona deacetilase
HDACis - Inibidores de histonas deacetilases
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ID - Índice de danos
IL-10 - Interleucina 10
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NARP - Petraxina regulada de atividade neuronal
NF-KB - Fator nuclear Kappa B
SAHA - Ácido hidroxamico suberoilânilide
SAMP8 - Ratos propensos a senescência acelerada 8
SIRT - Sirtuínas
TNF α - Fator de necrose tumoral
TrKB - Receptor beta tirosina cinase

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Pirâmide da estrutura etária no Brasil.....	26
Figura 2 - Alterações epigenéticas associadas ao envelhecimento.....	29
Figura 3 - Protocolo experimental 1.....	43
Figura 4 - Protocolo experimental 2.....	43
Figura 5 - Efeito da curva dose-resposta com D-gal via oral nas doses de 100, 200 e 300 kg/kg para indução do modelo animal de envelhecimento na memória de habituação avaliada no campo aberto.	50
Figura 6 -Efeito da curva dose-resposta com D-gal via oral nas doses de 100, 200 e 300 kg/kg para indução do modelo animal de envelhecimento na memória espacial avaliada pelo teste de labirinto em Y.....	51
Figura 7 - Efeito da curva dose-resposta com D-gal via oral nas doses de 100, 200 e 300 kg/kg para indução do modelo animal de envelhecimento na memória aversiva avaliada pelo teste de esquiava inibitória.....	52
Figura 8 - Efeito da curva dose-resposta com D-gal via oral nas doses de 100, 200 e 300 kg/kg para indução do modelo animal de envelhecimento nos níveis de glicemia sanguínea.	53
Figura 9 - Efeito do tratamento com butirato de sódio (BS) em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses na memória de habituação avaliada no campo aberto.	55
Figura 10 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses na memória espacial avaliada pelo teste de labirinto em Y.	56
Figura 11 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses na memória aversiva avaliada pelo teste de esquiava inibitória.	58
Figura 12 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses nos níveis de glicemia sanguínea.....	59
Figura 13 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg)nas idades de 2, 6 e 16 meses na atividade das histonas deacetilases (HDACs) no córtex frontal e hipocampo de ratos.....	60
Figura 14 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses nos danos ao DNA avaliados pelo ensaio cometa no sangue.	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 ENVELHECIMENTO	25
1.2 MODELOS ANIMAIS DE ENVELHECIMENTO	30
1.3 BUTIRATO DE SÓDIO	33
1.4 BUTIRATO DE SÓDIO E O ENVELHECIMENTO	35
1.5. JUSTIFICATIVA.....	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVOS GERAIS	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	41
3.2 TRATAMENTO	41
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	44
3.4 COLETA DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES	45
3.5 DOSAGEM DE GLICEMIA	46
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS HDAC	46
3.7 ENSAIO COMETA – DEGRADAÇÃO DO DNA	47
3.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	48
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4 RESULTADOS	49
4.1 REALIZAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DA D-GAL.....	49
4.2 AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE BS NO MODELO ANIMAL DE D-GAL EM ANIMAIS COM 2, 6 OU 16 MESES.....	53
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	75
ANEXO	95
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é um processo biológico complexo, caracterizado por alterações estruturais e funcionais das células e tecidos, podendo levar a redução das funções cognitivas e aumentar a suscetibilidade para doenças associadas à idade (Siqueira et al., 2004; Siqueira et al., 2005; Paradies et al., 2011; Zhang et al., 2014). Pode ser entendido como uma etapa do processo natural da vida, cuja característica principal é a acentuada perda da capacidade de adaptação e menor expectativa de sobrevivência. Esta condição torna o indivíduo mais vulnerável e predisposto a morbidades e mortalidade (Borba Lde et al., 2012). Algumas alterações são características naturais do envelhecimento, tais como o declínio da memória, as alterações na visão, a perda progressiva da audição e a diminuição da coordenação motora e da força muscular (Ziv e Melamed, 2010).

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), a população idosa no mundo está crescendo substancialmente rápido. Há uma estimativa de que a população idosa, ou seja, com 60 anos ou mais, entre 2015 e 2030 crescerá 56 %. Esta projeção prevê que de 901 milhões de idosos, passarão para 1,4 milhões no mundo. Em 2050 este número poderá chegar a ultrapassar o dobro em relação a 2015, podendo atingir 2,1 bilhões de indivíduos idosos. Além disso, o número de indivíduos com idade igual ou superior a 80 anos, os chamados “super idosos” está crescendo mais rápido do que o número de idosos entre 60 e 79 anos. Isso é baseado na projeção desde 2015 até 2050 em que o número de 125 milhões de super idosos passará para 434 milhões, atingindo mais que o triplo da população de 2015. Nos próximos 13 anos, espera-se crescimento rápido da população idosa, com idade de 60 anos ou mais, na América Latina e Caribe com uma projeção de 71%, seguido pela Ásia, 66%, África, 64%, Oceania, 47%, América do Norte, 41%, e Europa, 23%. Neste contexto, uma consequência inevitável e que está ocorrendo é a inversão da pirâmide populacional, que mostra mudanças no tamanho da população por faixa etária ao longo do tempo. É possível observar esta inversão no Brasil, cujo o número da população idosa está aumentando em detrimento de nascimentos, reduzindo significativamente a população produtiva e aumentando a população idosa. Isso significa dizer que o número de fertilidade está reduzindo e o número de idosos está aumentando em todo o mundo. Sendo assim, o envelhecimento é reflexo do mais baixo crescimento populacional aliado

a menores taxas de natalidade e fecundidade (figura 1) (ONU, 2013; ONU, 2015).

No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE), no senso de 2010 o contingente de idosos estava em 19,6 milhões de pessoas. A projeção deste número para 2050, divulgada pelo IBGE, será de 66,5 milhões em 2050, configurando um aumento em torno de 200% da população com idade igual ou superior a 60 anos. Esta projeção reflete a inversão da pirâmide da estrutura etária ao longo de 1950, 2015 e 2050 (figura 1) (ONU, 2015; Simões, 2016).

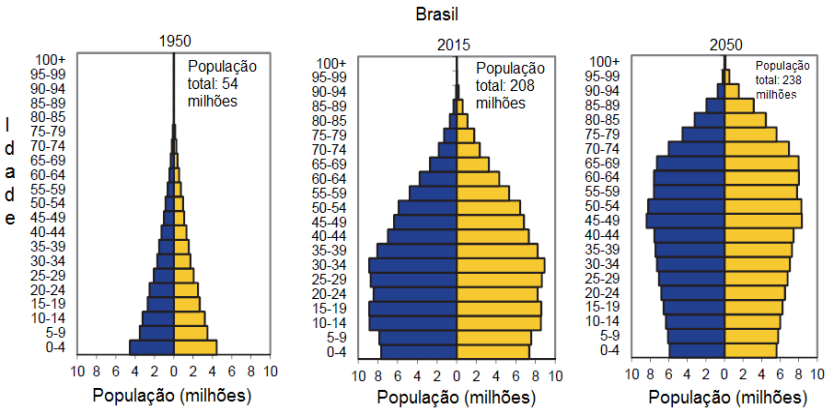


Figura 1 - Pirâmide da estrutura etária no Brasil

A pirâmide reflete a estrutura por faixa etária da população brasileira ao longo dos anos de 1950, 2015 e 2050. Amarelo: ♀ Azul: ♂.

Fonte: ONU, 2015.

A preocupação do aumento do envelhecimento populacional está no cuidado do idoso e na qualidade de vida do mesmo. Quanto maior a qualidade de vida no envelhecimento, maior a longevidade. Portanto, busca-se longevidade de forma saudável (Sanderson e Scherbov, 2015). Porém, durante o envelhecimento, o indivíduo apresenta um declínio do estado cognitivo observado por déficits de memória e capacidade para o uso estratégico da informação adquirida (Ismail et al., 2011). Estas alterações do estado cognitivo, estão relacionadas com a redução na eficácia de três recursos chave do processamento cognitivo: a velocidade com que a informação é processada, a memória de trabalho e as capacidades sensoriais e perceptuais. A respeito da repercussão da idade sobre o desempenho cognitivo observou-se que o tipo de memória mais afetado pela idade é a memória de curto prazo, em especial a

memória de trabalho, em razão da menor capacidade de armazenamento de informações (Park et al., 2000). Além disso, o prejuízo na memória espacial também é bastante evidente no envelhecimento (Gooney et al., 2004; Tapia-Arancibia et al., 2008).

Desta forma, o envelhecimento torna o indivíduo mais vulnerável a desenvolver diferentes doenças ou condições como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose, suscetibilidade a quedas e fraturas e imunidade reduzida (Tazkarji et al., 2016), além de doenças neurodegenerativas, dentre elas a Doença de Alzheimer (DA), a causa mais comum de demência associada ao envelhecimento (Ismail et al., 2011). As doenças neurodegenerativas constituem as principais causas de demência entre as pessoas idosas, entre as quais, a DA é a mais frequente, representando 50 a 60% dos casos (Ota et al., 2015). Particularmente a DA, é caracterizada por uma progressiva e lenta perda neuronal, levando a déficits neurológicos substanciais, contribuindo para a demência, e reduzindo a qualidade de vida, levando a morbidades e maior mortalidade em idosos (Ziv e Melamed, 2010). Portanto, o conhecimento acerca do envelhecimento torna-se fundamental para entender os mecanismos envolvidos no envelhecimento normal e patológico.

Independente das teorias que justificam as alterações ocasionadas pelo envelhecimento, todas convergem para a mesma conclusão, de que com o passar da idade, ocorre diminuição da funcionalidade do organismo como um todo. Durante o envelhecimento, o número de células nervosas cerebrais é notavelmente reduzido, bem como, o fluxo sanguíneo cerebral. Ocorre também perda neuronal em algumas partes específicas do cérebro, tais como o *locus cerúleos*, substância nigra, hipocampo, núcleo caudado, putâmen e córtex cerebral (Burke e Barnes, 2006).

Embora as teorias evolutivas do envelhecimento sejam bem estabelecidas, o conhecimento sobre como ocorre o processo em si é ainda limitado. Apesar dos esforços dos pesquisadores, a progressão e os mecanismos de envelhecimento não são ainda claramente compreendidos (Lopez-Otin et al., 2013). No decurso desse processo, diversos fenômenos fisiológicos ocorrem, tais como, redução no número de tecidos celulares, diminuição da taxa metabólica e aumento da incidência de doenças. A abundância e a heterogeneidade das hipóteses mecanicistas disponíveis sobre o envelhecimento sugerem que este fenômeno é altamente complexo e improvável de ser explicado por uma única via. Além disso, o envelhecimento permanece caracterizado por manifestações heterogêneas, não apenas em razão de variações

interindividuais, mas também em consequência das diversidades sociais (Cesari et al., 2013).

Apesar disso, sabe-se que diferentes vias genéticas e processos bioquímicos foram conservados durante a evolução e podem, pelo menos em parte, tentar explicar o este processo complexo. Foram elencados nove mecanismos que envolvem o processo de envelhecimento, entre eles encontram-se a instabilidade genômica, desgaste de telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, desregulação da detecção de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e alterações na comunicação celular (Lopez-Otin et al., 2013).

O principal foco deste estudo envolve as alterações epigenéticas relacionadas ao envelhecimento (Chung et al., 2009; Peleg et al., 2010; Jurgens e Johnson, 2012). Epigenética refere-se a alterações da expressão gênica induzidas por modificações da conformação da cromatina sem alterar a sequência de DNA (Bird et al., 2007). Essas modificações podem ocorrer nas caudas N-terminais das histonas e entre as mais estudadas destaca-se a acetilação (Kouzarides, 2007). Em geral, a acetilação de histonas facilita o processo de transcrição, enquanto que a desacetilação atenua este processo (Turner, 2002; Waggoner, 2007). Evidências têm demonstrado alterações epigenéticas em áreas específicas do cérebro de animais envelhecidos (Castellano et al., 2012), bem como em humanos idosos (Oh et al., 2016; Zeng et al., 2016) que podem desempenhar um papel crucial no envelhecimento, sendo correlacionadas a doenças, tais como diabetes, câncer, distúrbios neurodegenerativos e psiquiátricos (Berdasco e Esteller, 2012; Castellano, 2012; 2014).

É interessante destacar que a formação da memória tem sido associada com aumento dos níveis de acetilação de histonas em roedores (Levenson et al., 2004; Vecsey et al., 2007; Bousiges et al., 2010). Neste contexto, Reolon e colaboradores (2011) demonstraram que a administração de inibidores das histonas desacetilases (HDACis) reduziu o declínio de memória associado ao envelhecimento. O tratamento com HDACis demonstrou melhorar os déficits de memória em modelos experimentais de ratos idosos com disfunção de memória (Reolon et al., 2011). Além disso, foi proposto que a acetilação de histonas induz a transcrição do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Bekinschtein et al., 2008). O BDNF liga-se a receptores tirosina kinase B (trkB, do inglês, *BDNF-tyrosine kinase receptor B*) o qual ativa vias intracelulares como a cinase relacionada a sinais extracelulares (Dellu et al., 1992) e a proteína cinase dependente Ca^{2+}

/calmodulina II (CaMKII). Esta ativação contribui para o aumento de espinhos dendríticos e plasticidade sináptica. Contudo, a redução da acetilação de histonas e da síntese de BDNF podem estar ligadas a prejuízos na plasticidade sináptica observados durante o envelhecimento em roedores (Figura 2) (Mendelsohn e Larrick, 2012).

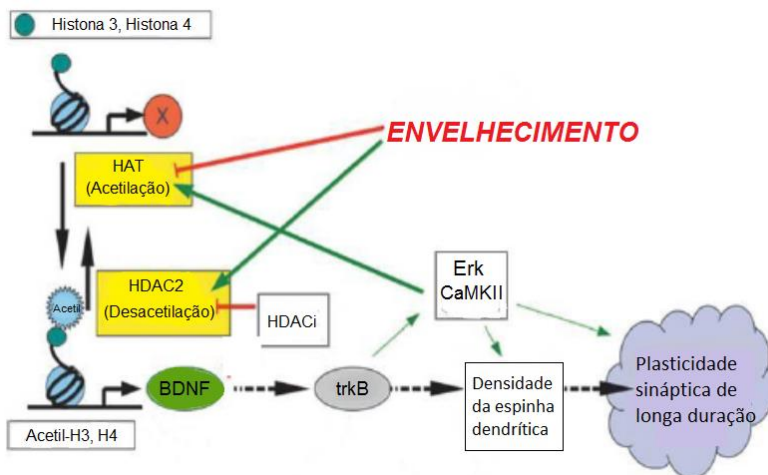


Figura 2 - Alterações epigenéticas associadas ao envelhecimento.

O envelhecimento inibe a histona acetil transferase (HAT), reduzindo a transcrição gênica. Inibidores de histonas desacetilases (HDACis) contribuem para a expressão gênica como do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) que se liga ao seu receptor tirosina cinase (trkB), promovendo aumento da densidade dendrítica e contribuindo para a plasticidade sináptica de longa duração.

Fonte: Adaptado de (Mendelsohn e Larrick, 2012).

O tratamento farmacológico com HDACis, como o butirato de sódio (BS) (Kuro-o et al., 1997), induz um estado hiperacetilado da histona, regulando a acessibilidade de transcrição da cromatina, afetando a expressão gênica e os mecanismos essenciais na formação da memória atuados em doenças neurológicas subjacentes (Poulaki et al., 2009). Os HDACis podem estar regulando mecanismos de plasticidade gerando estabilidade e melhorando a eficiência da consolidação da memória original quando administrados em momentos específicos após a aprendizagem. Isto está de acordo com resultados anteriores obtidos por Blank (2014) e com evidências indicando que o aumento da acetilação induzida por HDACis é uma característica molecular de memórias mais

fortes e mais persistentes (Blank et al., 2014). A descoberta de efeitos do BS no aumento da memória específica em ratos velhos pode também ser parcialmente explicada pelo fato de que os marcadores epigenéticos nas histonas não podem ser desregulados nestes animais e possivelmente a inibição de HDAC por BS afeta os substratos não histônicos (Blank et al., 2015). Portanto, fármacos que atuam em mecanismos epigenéticos podem ser importantes alvos terapêuticos para o envelhecimento.

1.2 MODELOS ANIMAIS DE ENVELHECIMENTO

Sabendo que o envelhecimento torna o indivíduo mais vulnerável e predisposto a morbidades e mortalidade, há uma grande necessidade de se estudar os mecanismos envolvidos neste processo. Alguns modelos animais de envelhecimento são utilizados como ferramentas para este fim, uma vez que a reprodução do envelhecimento natural em cobaias animais é de difícil de realização devido a sua alta mortalidade. Entre os principais modelos conhecidos podem ser citados os modelos animais induzidos pela D-galactose (D-gal) (Hsieh et al., 2011), o modelo dos animais propensos a senescência acelerada 8 (SAMP8), do inglês *Senescence accelerated mice P8* (Takeda et al., 1994) e o modelo animal do gene *Klotho* (Kuro-o et al., 1997).

A D-gal é um açúcar redutor que pode ser metabolizado em níveis normais. No entanto, o excesso desse açúcar no organismo leva a uma sobrecarga enzimática, levando ao aumento de galactitol pela enzima aldolase redutase (Kolosha et al., 2000). O excesso de galactitol induz a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) podendo levar a danos nas células e tecidos (Lu et al., 2010a; Prisila Dulcy et al., 2012; Zhang et al., 2014; Yu et al., 2015b; Shen et al., 2016).

A alteração neuro-patológica induzida por D-gal tem sido aplicada como um modelo animal de envelhecimento, uma vez que o excesso de oferta da D-gal induz apoptose, inflamação e estresse oxidativo no sistema nervoso. Em paralelo, por alterar a função do material genético, podendo resultar no envelhecimento e morte celular prematura (Hsieh et al., 2009; Yang et al., 2014). *In vivo* o estresse oxidativo induzido pela administração de D-gal pode mimetizar o envelhecimento natural em ratos (Chang et al., 2014; Budni et al., 2016; Budni et al., 2017). Além disto, a D-gal pode formar produtos finais de glicação avançada (AGES) (Siqueira et al., 2004; Yu et al., 2015b), por ser um açúcar redutor. Então pode reagir com grupos amino das proteínas e peptídeos formando os AGEs que estão aumentadas durante o envelhecimento (Lu et al., 2010a; Prisila Dulcy et al., 2012; Zhang et al., 2014; Yu et al.,

2015; Shen et al., 2016) e têm sido associadas à patogênese de muitas doenças vinculadas à idade, tais como a DA (Hsieh et al., 2009). Além disso, D-gal induz redução de enzimas antioxidantes (Anand et al., 2012); degeneração neuronal no hipocampo (Yu et al., 2015b; Pourmemar et al., 2017) e aumento da expressão de citocinas inflamatórias, NF- κ B e proteínas relacionadas à formação de AGEs (Yu et al., 2015b) no cérebro de camundongos. A injeção subcutânea de D-gal (120 mg/kg) por 42 dias também ocasionou aumento de marcadores de dano em DNA de células hematopoiéticas de camundongos, e inclusive aumento de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) no soro, um biomarcador, formado quando o DNA é oxidativamente modificado por EROs, sendo um dos símbolos biológicos mais sensíveis para o estresse oxidativo (Li et al., 2016). Todas essas alterações citadas são conhecidamente características do envelhecimento, as quais fazem parte das teorias que visam explicar a senescência (Lipsky e King, 2015).

Com isso, a D-gal induz alterações comportamentais como dano na memória espacial e no aprendizado que reproduzem o processo natural do envelhecimento em ratos e camundongos. Vários estudos sustentam que a administração sistêmica crônica de D-gal pode ser utilizada como um modelo animal de envelhecimento (Cui et al. 2006; Hsieh et al. 2009; Chen et al., 2010; Prisila Dulcy et al., 2012; Gao et al., 2015; Budni et al., 2016; 2017).

Além de mimetizar alterações relacionadas ao envelhecimento como estresse oxidativo, AGE e inflamação, a administração crônica e sistêmica de D-gal (intraperitoneal ou subcutânea) induz alterações como as observadas na DA (Hsieh et al., 2011; He et al. 2012; Qin et al. 2012) aumentando significativamente o nível do peptídeo beta-amilóide no hipocampo de ratos. Estudos anteriores mostraram que a administração intraperitoneal de D-gal em ratos também aumentou a expressão da proteína precursora amilóide no cérebro, sendo este, um dos principais mecanismos fisiopatológicos na DA que induz uma cascata de eventos celulares que, em última análise, levam à perda neuronal e demência (Yang et al., 2014). Portanto, a D-gal, pode ser um importante modelo animal para induzir envelhecimento e foi este o modelo adotado para a realização dessa pesquisa.

Seguindo a linha de modelo animal de envelhecimento o modelo baseado nos camundongos SAMP8 tem sido geralmente utilizados como um modelo animal de envelhecimento relacionado com a DA (Canudas et al., 2005; Morley et al., 2012). Os camundongos SAMP8 também apresentam múltiplas características metabólicas, o que os torna candidatos adequados para a pesquisa da disfunção metabólica associada

ao envelhecimento (Akiguchi et al., 2017). Também já foi descrito, em experimento com os animais SAMP8, um aumento do estresse oxidativo (Butterfield e Poon, 2005; Morley et al., 2012), assim como níveis elevados de glicose, insulina e ácidos graxos (Liu et al., 2015; Yu et al., 2015a). Em comparação com os camundongos C57BL onde as intervenções ao longo da vida exigem de 18 a 26 meses de seguimento e são, por conseguinte, dispendiosas e demoradas, o modelo de camundongos SAMP8 proporciona uma alternativa economia de tempo e de energia, agilizando os estudos, pois apresentam uma rápida senescência (Takeda et al., 1994; Akiguchi et al., 2017).

Ainda se tratando de modelo animal de envelhecimento apresenta-se os animais com gene *Klotho* que foi identificado como sendo um suposto gene supressor do envelhecimento. A proteína Klotho é uma proteína transmembrana de tipo I que é expressa principalmente no cérebro e nos rins (Kuro-o et al., 1997; Chen et al., 2007; Wang e Sun, 2009). Pode funcionar tanto quanto uma proteína transmembrana como um fator humoral (Wang e Sun, 2009). O modelo animal de camundongo nocaute para a proteína Klotho desenvolve anormalidades em vários órgãos e sistemas que são semelhantes às envolvidas no envelhecimento humano (Nagai et al., 2003; de Vries et al., 2017). No cérebro de animais nocaute, os marcadores de estresse oxidativo aumentam antes do início do comprometimento cognitivo. Estes animais acabam morrendo em decorrência destes distúrbios ao atingirem em torno de quatro meses de idade. Em contrapartida, os animais que expressam uma alta quantidade dessa proteína tendem a viver de 20 a 30% mais tempo e também se tornam mais resistentes ao estresse oxidativo (Kurosu et al., 2005; Yamamoto et al., 2005; de Vries et al., 2017).

A presença de células senescentes já foi observada no cérebro. Embora seja reconhecido que o metabolismo energético celular e a homeostase redox estão comprometidos no cérebro envelhecido e nas doenças neurodegenerativas, ainda permanecem desconhecidas as alterações na fisiologia celular geral que podem estimular a indução de senescência celular, bem como a sua relação com os eventos anteriores carecendo de mais estudos nesta área (Maciel-Baron et al., 2017). Portanto, modelos animais de envelhecimentos são fundamentais para avaliar as alterações comportamentais e moleculares induzidas pelo mesmo, bem como, possíveis alvos que retardam este processo, ou que tornam este, o mais saudável possível.

1.3 BUTIRATO DE SÓDIO

O Butirato de Sódio (BS), cuja fórmula química é $C_4H_7O_2Na$, é um sal de ácido graxo de cadeia curta, derivado do ácido butírico, que atua como um acidificante e como um regulador de funcionamento epigenético natural. É um importante agente inibidor das HDACs e vem sendo apontado como um agente importante na regulação de expressão gênica (Valvassori et al., 2015). O efeito do BS em cultura celular resulta em aumento dos níveis de mRNA, levando a um aumento de transcrição do gene de interesse e a uma diminuição da estabilidade do mRNA, decréscimo da fosforilação de histonas, que interfere na progressão do ciclo celular, aumento na hiperacetilação de histona, gerando perda de estrutura da cromatina com consequente dano ao citoesqueleto e menor acesso à RNA polimerase para síntese de mRNA, aumento da produção, no retículo endoplasmático, de proteínas chaperonas (GRP78 e 94) (Crowell et al, 2008). Além disso, o BS é um reagente bem conhecido por sua capacidade de causar um atraso no ciclo celular, fazendo com que as células permaneçam mais tempo na fase G1 do ciclo celular (fase onde se dá a produção de proteínas) resultando em uma redução da taxa de divisão celular, o que gera uma diminuição no número de células viáveis e um aumento na produtividade específica da proteína de interesse, podendo ser uma alternativa terapêutica para diferentes tipos de câncer (Kumar et al., 2007, Sunley e Butler; 2010).

As modificações de histonas são importantes mecanismos para a modulação e expressão gênica, sofrendo processos de acetilação e desacetilação. O processo de acetilação é realizado pela enzima histona acetiltransferase (HAT). Este está ligado a promoção do aumento da transcrição do gene, enquanto que a desacetilação realiza o processo inverso, ou seja, diminui a expressão do gene, através da enzima histona desacetilase (HDAC) que se encarrega por catalisar a desacetilação de histonas. (Murugan et al., 2015). Esse processo está relacionado a mecanismos epigenéticos que, por sua vez, estão envolvidos tanto em processos que regulam a saúde mental e a homeostase do organismo, quanto em condições neurodegenerativas, psiquiátricas e doenças inflamatórias (Steckert et al., 2015). Na inflamação, a hiperacetilação de histonas ocasionada pelo BS altera negativamente a expressão de genes inflamatórios diminuindo a produção e secreção de citocinas de ação pró-inflamatórias, mas também aumenta a expressão da citocina anti-inflamatória como a interleucina 10 (IL-10) (Bailón et al., 2010; Ferreira et al., 2012; Ni et al., 2010; Saemann et al., 2000). O efeito

anti-inflamatório do BS apresenta efeitos protetores também no tecido adiposo modulando a inflamação, uma vez que adipócitos em co-cultura com macrófagos apresentaram elevada expressão proteica e gênica das citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e quimiocina do tipo CCL2. Porém, na presença de BS a expressão gênica e secreção dessas citocinas foram marcadamente reduzidas (Ohira et al., 2013).

As HDACs são identificadas e classificadas em quatro grupos com base em sua homologia (Didonna e Opal, 2015) e são uma superfamília de 18 proteínas formada por 4 principais classes: classe I (HDAC1-3, 8), classe II que é dividida em duas subclasses IIa (HDAC4, 5, 7 e 9) e IIb (HDAC 6 e 10) e classe III (Sirtuin 1-7). HDAC11 é o único membro da Classe IV, que é também uma HDAC dependente de zinco (Wu et al., 2016; Machado-Vieira et al., 2011). As HDAC de classe I, consistindo em HDAC1, 2, 3 e 8, são homólogas à levedura RPD3, enquanto que, as HDAC de classe II têm elevada identidade com a HDAC1 de levedura, consistindo em HDAC 4, 5, 6, 7, 9 e 10 (de Ruijter et al., 2003; Wu et al., 2016). As HDACs de classe III, são denominadas sirtuínas (SIRT), sendo indetificadas 7 em mamíferos, SIRT 1-7, homólogos da levedura SIR2. Em comparação com as HDAC dependentes de zinco de classe I e classe II, as HDACs de classe III são dependentes de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD). É importante ressaltar que a classe I e II são as classes mais estudadas no SNC (Machado-Vieira et al., 2011). O BS age como um inibidor não-específico da HDAC de classe I e II (Malvaez et al., 2010; Machado-Vieira et al., 2011).

Estudos tem demonstrado que o processo de envelhecimento interrompe a resposta epigenética celular, promovendo dificuldade na acetilação das histonas, que tem como consequência a perda neuronal e de memória, que são processos bioquímicos e comportamentais diretamente envolvidos no envelhecimento tanto de roedores quanto de humanos (Rando e Chang, 2012; Brunet e Berger, 2014; López-León e Goya, 2017). Dessa forma, os HDACis, como o BS, são um potencial agente terapêutico, pois podem restaurar o nível de acetilação das histonas nas células, promovendo efeito sobre a restauração da memória (Castellano et al., 2014). Consequentemente, a inibição das HDACs induz o aumento nos níveis de acetilação das proteínas histonas ocasionando uma maior abertura da cromatina facilitando a interação da RNA polimerase com o DNA para modular a transcrição (Camelo et al., 2005; Wu et al., 2016).

Vale ressaltar também que o BS está sendo investigado para o tratamento de alguns tipos de câncer como o câncer de mama e de

próstata. Porém os estudos focam mais em análises em roedores e *in vitro*, indicando que tem grande potencial como alvo terapêutico para o câncer (Fialova et al., 2016; Damaskos et al., 2017). O BS ainda está sendo testado em estudos clínicos para avaliar seu efeito e sua segurança. Um estudo conduzido por Luceri et al. (2016) mostrou o efeito da administração de BS (2 g/30 ml; 600 mmol/L) na forma de enema, duas vezes por dia, durante 30 dias, em pacientes com endostomia ou desvio colorretal, e avaliou biomarcadores renais, como ureia e creatinina, bem como biomarcadores para a função hepática, como a alanina transaminase e γ -glutamil transferase. Foi observado que BS reduz a atrofia colorretal melhorando a integridade tecidual sem causar efeitos colaterais ou alteração das enzimas hepáticas e renais (Luceri et al., 2016). Estes dados são importantes para a utilização do BS em humanos, indicando segurança na sua administração.

1.4 BUTIRATO DE SÓDIO E O ENVELHECIMENTO

Muitos estudos relacionam o envelhecimento com o BS, mostrando uma relação estreita. De fato, um estudo mostrou que o tratamento com BS retardou as sequelas neuropatológicas no modelo de camundongo transgênico (R6/2) para doença de Huntington promovendo o aumento da acetilação de histonas contra a neurotoxicidade induzida pelo ácido 3-nitropropiónico, desempenhando uma ação protetora contra este dano (Ferrante et al., 2003). A pesquisa realizada por Steckert et al. (2015) foi demonstrado que a administração de BS foi capaz de reverter o prejuízo na memória aversiva e inibiu a atividade da HDAC no córtex frontal e hipocampo, 10 dias após a perfuração e ligação cecal (CLP), um modelo animal de sepse. Estes resultados apontam um papel importante para o mecanismo epigenético nos prejuízos cognitivos de longo prazo observado em animais sobreviventes a indução de sepse (Steckert et al., 2015). Em ambos os trabalhos, foi evidenciado que o BS se apresenta como uma terapia eficaz para a inibição das HDAC e aumento da acetilação das mesmas em roedores.

A administração de BS no tratamento de camundongos, aumentou significativamente os níveis de acetil-histona H3, proliferação celular e neurogênese no giro denteado quando administrado em conjunto com a piridoxina. Este estudo demonstrou que o BS melhora distintamente o desenvolvimento dos dendritos, indicando que a inibição de HDAC promove, sinergicamente, a neurogênese induzida por um aumento de piridoxina e a proliferação neuronal (Yoo et al., 2015). Outro estudo utilizando camundongos C57BL testou a eficácia do BS na modulação

de HDAC na sarcopenia que se caracteriza pela perda de massa muscular, associada à perda de inervação durante o envelhecimento. Foi observado que o BS estimulou o efeito protetor sobre a massa muscular, reduziu a massa gorda e melhorou o metabolismo da glicose em animais C57BL com 26 meses de idade. O BS também aumentou marcadores da biogênese mitocondrial no músculo esquelético e o consumo de oxigênio em todo o corpo (Fujimaki et al., 2015; Walsh et al., 2015). Blank et al. (2015) observaram que o tratamento com BS imediatamente após o treino dos animais na esQUIVA inibitória produziu melhora na consolidação da memória, a qual persistiu até 14 dias através dos testes consecutivos de retenção da memória em ratos Wistar velhos (20-24 meses), porém não afetou a memória de ratos jovens. Estes resultados indicam que o BS teve efeito específico no envelhecimento (Blank et al., 2015). Recentemente, foi observado que BS promoveu aumento dos níveis de acetilação de histonas H3K9 e H3K14 no promotor de genes para a plasticidade neuronal, promovendo sua expressão e melhora da memória de camundongos Swiss com 20 meses de idade (Singh e Thakur, 2017). Juntamente com o envelhecimento ocorre um aumento da desacetilação de histonas e uma diminuição em sua acetilação, indicando que inibidores de HDAC podem ter um papel terapêutico no declínio cognitivo induzido pelo envelhecimento e induzido por doenças relacionadas ao envelhecimento, como doenças neurodegenerativas, regulando a expressão gênica (Sharma et al., 2015). Portanto, os estudos indicam que o BS tem efeito promissor contra os danos causados pelo envelhecimento.

1.5. JUSTIFICATIVA

Estudos têm demonstrado que a administração de D-gal em longo prazo é utilizada para acelerar o envelhecimento em roedores (Prisila Dulcy et al., 2012; Gao et al., 2015; Budni et al., 2016; 2017). O processo de envelhecimento interrompe a resposta epigenética celular promovendo a dificuldade na acetilação das histonas, tendo como consequência a perda de neurônios e da memória que são processos bioquímicos e comportamentais envolvidos no envelhecimento. Por este motivo os inibidores de histonas desacetilases são um potencial terapêutico, pois podem restaurar o nível de acetilação das histonas nas células ocasionando a restauração da memória. Há evidências de que os padrões de acetilação de histonas são semelhantes em humanos quando comparados com os modelos animais de envelhecimento (Castellano et al., 2014). Essas descobertas contribuem para o avanço nas pesquisas

voltadas para a proporção de uma melhor qualidade de vida no envelhecimento. Neste sentido, a utilização do BS como HDACi acaba se tornando uma opção de intervenção farmacológica relevante na tentativa de reverter os danos de memória característicos do envelhecimento. Portanto, este estudo visa primeiramente padronizar o modelo animal de envelhecimento induzido por D-gal. Posteriormente, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do BS na memória, modulação das HDACs e dano ao DNA em ratos Wistar com 2, 6 ou 16 meses e submetidos ao modelo animal de envelhecimento induzido pela administração de D-gal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Padronizar o modelo animal de D-gal e avaliar o efeito do Butirato de Sódio (BS), na memória, modulação da HDAC e dano ao DNA em ratos Wistar com 2, 6 ou 16 meses e submetidos ao modelo animal de envelhecimento induzido pela administração de D-gal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Realizar uma curva dose-resposta com D-gal 100, 200 e 300 mg/kg em animais com 2 meses e avaliar seu efeito na memória de habituação através do teste de habituação ao campo aberto;

-Realizar uma curva dose-resposta com D-gal 100, 200 e 300 mg/kg em animais com 2 meses e avaliar seu efeito na memória aversiva através do teste de esQUIVA inibitória;

-Realizar uma curva dose-resposta com D-gal 100, 200 e 300 mg/kg em animais com 2 meses e avaliar seu efeito na memória espacial através do teste do labirinto em Y;

-Realizar uma curva dose-resposta com D-gal 100, 200 e 300 mg/kg em animais com 2 meses e avaliar seu efeito nos níveis glicêmicos;

-Avaliar a memória de habituação através do teste de habituação ao campo aberto em ratos com 2, 6 ou 16 meses e administrados com D-gal e tratados com BS;

-Avaliar a memória aversiva através do teste de esQUIVA inibitória em ratos com 2, 6 ou 16 meses e administrados com D-gal e tratados com BS;

-Avaliar a memória espacial através do labirinto em Y em ratos com 2, 6 ou 16 meses e administrados com D-gal e tratados com BS;

-Avaliar a atividade da HDAC em córtex frontal e hipocampo de ratos com 2, 6 ou 16 meses e administrados com D-gal e tratados com BS;

-Avaliar o dano no DNA através do teste cometa no sangue de ratos com 2, 6 ou 16 meses e administrados com D-gal e tratados com BS.

-Avaliar os níveis glicêmicos em animais com 2, 6 ou 16 meses e administrados com D-gal e tratados com BS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* com 2, 6 e 16 meses de idade, machos pesando em média 350g a 500g. Foram usados 40 animais com 2 meses de idade para realizar a curva dose-resposta, e 40 animais para cada idade (2, 6 ou 16 meses) para o tratamento com BS e submetidos ao modelo animal de envelhecimento induzido por D-gal. Ao total foram utilizados 160 animais para este estudo. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense e mantidos em gaiolas em ciclo claro/escuro de 12h, com alimentação e água, disponíveis, com temperatura entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$. O protocolo experimental do presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense (073-2014-02).

3.2 TRATAMENTO

O presente estudo foi realizado em duas grandes etapas que foram denominadas protocolo experimental 1 e protocolo experimental 2.

No **protocolo experimental 1**, primeiramente foi realizada uma curva dose-resposta com a D-gal nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg em animais com 2 meses. D-Gal foi administrada por via oral (gavagem) durante 30 dias, uma vez ao dia (10 horas da manhã), no qual foi utilizado uma agulha de gavagem, que foi inserida até o esôfago. Nos animais do grupo controle foram administrados água por via oral durante 30 dias. No 30º dia os animais foram submetidos ao treino de habituação de campo aberto e no 31º dia iniciou os testes comportamentais de campo aberto, *Y-maze* e esquivas inibitórias. Imediatamente após o último teste comportamental os animais foram submetidos a coleta de sangue da cauda para avaliação dos níveis de glicose e após foram mortos (figura 3) (Cui et al., 2006). Neste protocolo foram utilizados 4 grupos experimentais com 10 animais cada grupo:

- Controle (água);
- D-gal 100 mg/kg;
- D-gal 200 mg/kg;
- D-gal 300 mg/kg;

No **protocolo experimental 2** foram utilizados 120 animais. Este protocolo foi subdividido em duas etapas para melhor condução dos

experimentos. Desta forma cada sub-etapa, do protocolo experimental 2, apresentaram 60 animais com todos os grupos experimentais. Neste protocolo experimental 2 foram utilizados animais com diferentes idades (2, 6 ou 16 meses). A D-gal ou água como grupo controle foram administrados durante 30 dias, como no protocolo 1. Porém no 24º dia de tratamento iniciou-se, juntamente com a D-Gal, o tratamento com BS ou salina, que foram administrados por via intraperitoneal. O BS (600 mg/kg) foi diluído em soro fisiológico (salina) e administrado até o 30º dia. As injeções intraperitoneais de BS ou salina e as injeções por via oral de D-gal ou água foram administradas uma vez ao dia (10 horas da manhã). No 30º dia de administração de D-Gal ou água e no 7º dia de administração de BS ou salina, os animais com 2, 6 ou 16 meses foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto, *Y-maze* e esquiwa inibitória. Imediatamente após o último teste comportamental os animais foram submetidos a coleta de sangue da cauda para avaliação dos níveis de glicose e dano ao DNA e após foram mortos para a coleta do córtex frontal e hipocampo para a avaliação da atividade das HDACs (figura 4).

Neste protocolo foram utilizados 12 grupos experimentais com 10 animais de cada grupo:

- Animais de 2 meses controle (água) + controle (salina);
- Animais de 2 meses água + BS;
- Animais de 2 meses D-gal + salina;
- Animais de 2 meses D-gal + BS;
- Animais de 6 meses água + salina;
- Animais de 6 meses água + BS;
- Animais de 6 meses D-gal + salina;
- Animais de 6 meses D-gal + BS;
- Animais de 16 meses água + salina;
- Animais de 16 meses água + BS;
- Animais de 16 meses D-gal + salina;
- Animais de 16 meses D-gal + BS;

Protocolo experimental 1

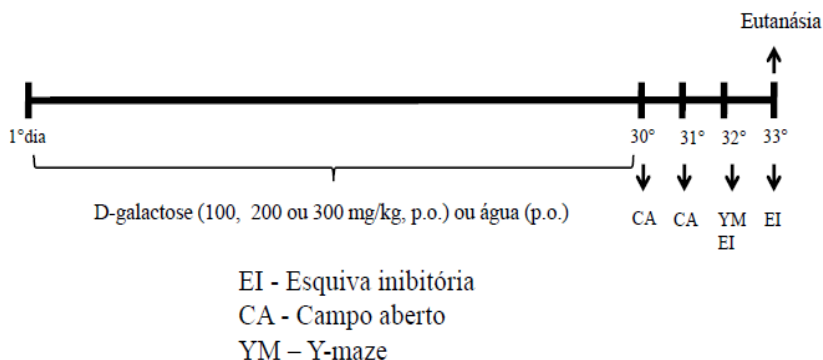


Figura 3 - Protocolo experimental 1.

Curva dose-resposta com D-gal via oral nas doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 300 mg/kg para indução do modelo animal de envelhecimento.

Fonte: do autor, 2017.

Protocolo experimental 2

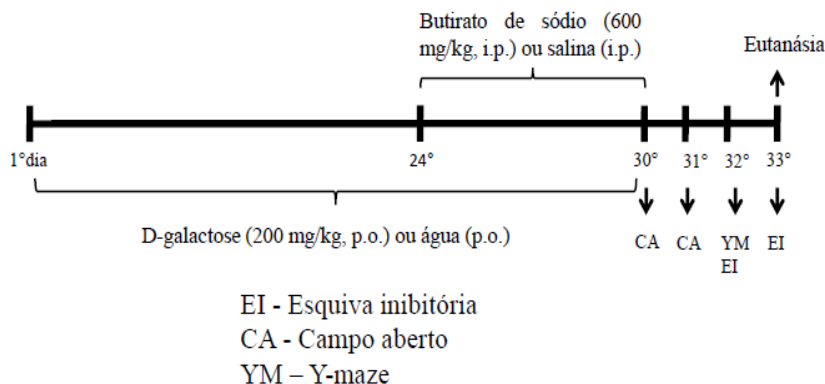


Figura 4 - Protocolo experimental 2.

Administração de butirato de sódio em animais submetidos ao modelo animal de envelhecimento induzido pela D-gal em ratos Wistar com 2, 6 ou 16 meses de idade.

Fonte: do autor, 2017.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Habituação ao campo aberto: No 30º dia, os animais foram submetidos ao treino no aparato de habituação ao campo aberto. No 31º dia os ratos foram submetidos ao teste habituação ao campo aberto. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória. A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras (rearing) é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade, uma vez que esse comportamento frequentemente se correlaciona com outras atividades como a autolimpeza corporal (grooming). Foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 paredes de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão teste foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repetiu o procedimento do treino. Os números de cruzamentos através das linhas pretas e o número de “rearings” foram avaliados em ambas as sessões. Crossing (número de cruzamentos, atividade motora) e rearings (número de levantamentos, atividade exploratória) (Vianna et al., 2000). Ao final, com este teste comportamental, foi avaliada a memória de habituação.

Labirinto em Y (Y-maze): No 32º dia os ratos foram submetidos ao teste do labirinto em Y onde foi avaliada a memória de reconhecimento espacial dos animais (Dellu et al., 1992). O aparelho possui três braços iguais na cor preta (50 x 10 x 20 cm, cada braço) afastados em 120º e foi colocado em uma sala com luz vermelha e com pistas visuais nas paredes de cada braço para facilitar a localização espacial dos animais. O protocolo consistiu de duas sessões separadas por um intervalo de 120 min. Na primeira sessão, o animal foi colocado no final de um dos braços chamado de “braço de partida”, e teve livre acesso para explorar o “outro braço” durante 5 min. Nesta sessão inicial, o terceiro braço do labirinto foi bloqueado por uma porta guilhotina e foi chamado de “braço novo”. O rato foi então removido do labirinto e retornou a caixa moradia. Depois de 2 horas, na segunda sessão, o animal foi novamente colocado no “braço de partida” do labirinto para explorar livremente

todos os três braços durante 5 min. O número de entradas e o tempo de permanência em cada braço foram registrados. Os resultados foram expressos pelo tempo de permanência no “braço novo”.

Esquiva Inibitória: Consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal. Uma plataforma é colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão de treino (32º dia), depois da realização do labirinto em Y, os animais foram colocados sobre a plataforma e mediu-se o tempo em que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma (latência). Imediatamente após descer da plataforma, o animal recebeu um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo em que ele levou para descer (latência), porém, não foi administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste foram de 5 segundos para medir a memória imediata, 1,5 horas para medir memória de curta duração e 24 horas para memória de longa duração. A esquiva inibitória avalia a memória aversiva do animal (Izquierdo et al., 1998).

3.4 COLETA DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES

Após os testes comportamentais foi coletado o sangue dos animais por uma incisão realizada na cauda, e após, os animais sofreram eutanásia por decapitação e as estruturas cerebrais do hipocampo e do córtex frontal para posteriores análises moleculares e bioquímicas. Durante o procedimento de eutanásia, os animais ficaram mantidos em uma sala individualizada, a 21°C, com livre oferta de água e alimento. Somente foram retirados de sua gaiola no momento da eutanásia. Durante o percurso até a sala, onde estava localizada a guilhotina, os cuidados com a manipulação do animal foram tomados. A guilhotina foi lavada e higienizada a cada decapitação. Apenas foram coletadas amostras cerebrais, depois da decapitação. As amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de glicose e realização do ensaio de cometa. As amostras de córtex frontal e hipocampo para a análise da atividade das HDACs foram mantidas em freezer -80°C até a análise bioquímica. O sangue total retirado para a análise de glicemia foi utilizado imediatamente após a coleta diretamente no aparelho para medir a glicemia. O sangue total coletado para a análise de cometa foi coletado em tubo com heparina e refrigerado até a realização da técnica de análise molecular.

3.5 DOSAGEM DE GLICEMIA

A concentração de glicose no sangue foi analisada com o glicômetro G-Tech (SD Biosensor Inc, Republic of Korea) e tiras G-Tech (SD Biosensor Inc, Republic of Korea). Logo após a análise comportamental, foi utilizado um lancetador para conseguir uma gota de sangue dos animais. Esta gota de sangue foi inserida no espaço da fita e aguardado alguns segundos para registrar a glicemia que apareceu no visor do glicosímetro.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS HDAC

Primeiramente foi realizada a extração nuclear utilizando um kit de extração (Cayman, EUA, cod. 10009277). Para isso as estruturas cerebrais, córtex frontal e hipocampo foram homogeneizados em tampão de lise citoplasmático contendo ditiotreitol (DTT) e inibidores da protease. A suspensão foi mantida em gelo durante 15 minutos e depois centrifugada a 250 x g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi ressuspense em dois volumes de tampão de lise citoplasmático frio. A suspensão foi homogeneizada utilizando uma seringa com a agulha de calibre pequeno e centrifugada em 8000 x g durante 20 min a 4 °C. O sedimento resultante conteve a porção nuclear da célula lisada. O sedimento foi ressuspense em tampão de extração nuclear contendo inibidores de protease e DTT, e a suspensão foi homogeneizada com uma seringa com a agulha de calibre pequeno. A amostra resultante foi mantida em agitação lenta durante 30-60 min num agitador orbital, a 4 °C. Após, a suspensão nuclear foi centrifugada em 16000 x g durante 5 min a 4 °C e o sobrenadante contendo o extrato nuclear foi transferido para um novo tubo e armazenado a -80 °C até análise posterior.

Para que fosse avaliada a atividade da HDAC, os extratos nucleares foram submetidos a um ensaio para a avaliação da atividade da HDAC com o uso do kit de Ensaio de HDAC (detecção colorimétrica), de acordo com as instruções do fabricante (Cayman, EUA, cod. 10011563). Resumidamente, as amostras de extrato nuclear foram homogeneizadas com tampão de ensaio de HDAC mais substrato de ensaio de HDAC em uma placa de 96 poços e incubadas a 30°C durante 45 min. Concomitantemente, uma curva padrão foi realizada com diluições em série de substratos dos kits de HDAC e controles positivos e negativos foram adicionados à placa. Após, a solução de ativador foi adicionada aos poços e, então, a placa foi incubada à temperatura ambiente durante

15 min. A leitura colorimétrica foi realizada num leitor de placas de ELISA, com 400 nm para a atividade de HDAC. O cálculo da atividade da HDAC foi realizado com base na curva padrão, e os valores foram apresentados em nM/ μ g de proteína.

3.7 ENSAIO COMETA – DEGRADAÇÃO DO DNA

O ensaio cometa foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por (Singh, 1988 #1732), com algumas modificações sugeridas por (Tice, 2000 #1736). O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados.

As células do sangue (alíquotas de 5 μ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95 μ L), respectivamente) e a mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após este procedimento, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com nitrato de prata (Villela, 2006 #1735), para posterior análise em microscópio óptico com aumento de 400x.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda, até 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins, 1997 #1734). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero (100 X 0 = 0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100 X 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideraram que o escore visual de 70 cometas é um método de

avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins, 1997 #1733). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise que ocorreu às cegas.

3.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As dosagens de proteínas foram determinadas pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951) e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados possuem uma distribuição normal. O teste de labirinto em Y e memória de habituação ao campo aberto foram analisados por teste t de *Student*, sendo os dados representados como média \pm erro padrão da média. O teste de esQUIVA inibitória foi analisado por Wilcoxon dentro do grupo (treino e teste), e Kruskal Wallis entre os grupos, e os dados foram representados como mediana \pm intervalo interquartil. Os dados de glicemia, dano ao DNA e atividade da HDAC foram analisados pela análise de variância de uma via (one way ANOVA). Os dados de dano ao DNA e atividade da HDAC, para cada idade, foi realizada a ANOVA de duas vias. O teste *post hoc* de Duncan foi utilizado quando apropriado. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 REALIZAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA DA D-GAL

Considerando que há muitas formas de utilização da D-gal para induzir o envelhecimento, o presente estudo, objetivou avaliar primeiramente, a melhor dose, que induz alterações semelhantes ao envelhecimento, baseado nos estudos anteriores, durante 30 dias por via oral. Para escolha da dose e padronização do modelo de envelhecimento induzido por D-gal 100, 200 ou 300 mg/kg, por via oral, em ratos Wistar com 2 meses de idade, foram realizados três testes comportamentais: teste de campo aberto, labirinto em Y e esQUIVA inibitória.

Os resultados obtidos no teste do campo aberto estão na figura 5. No teste de habituação ao campo aberto, primeiramente foram observadas se as diferentes doses de D-gal poderiam causar alguma alteração da atividade locomotora. Para tanto, foi aplicada a ANOVA de uma via para avaliar as diferenças da atividade locomotora entre os grupos experimentais analisados. Porém não foi observada nenhuma alteração na locomoção [$F(1,40) = 2,32$; $p = 0,09$]. Quando avaliada a memória de habituação ao campo aberto foi realizado o teste t de *Student* em cada grupo experimental para avaliar se houve diferença entre o treino e teste para cada grupo experimental. Foi observado que apenas os animais controle e tratados com D-gal 300 mg/kg reduziram o número de cruzamentos (figura 5A) [respectivamente: $t(1,10) = 2,93$; $p = 0,01$ e $t(1,10) = 2,63$; $p = 0,02$] e levantamentos (figura 5B) [respectivamente: $t(1,10) = 3,77$; $p = 0,003$ e $t(1,10) = 3,18$; $p = 0,01$], demonstrando o reconhecimento do ambiente em que já estiveram e portanto, exploraram menos, pois lembravam que já estiveram neste ambiente. Já os animais tratados com D-gal 100 e 200 mg/kg não reduziram a atividade exploratória, demonstrando dano na memória de habituação, ou seja, não lembravam que já exploraram aquele ambiente.

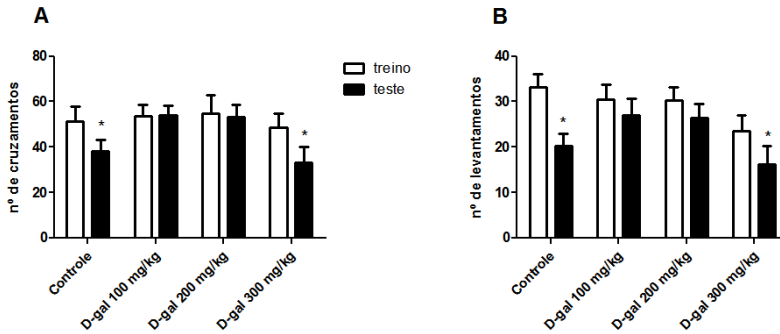


Figura 5 - Efeito da curva dose-resposta com D-gal via oral nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg para indução do modelo animal de envelhecimento na memória de habituação avaliada no campo aberto.

A figura mostra os resultados de cruzamentos (A) e levantamentos (B) dos animais no campo aberto. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado a sessão teste com a sessão treino do respectivo grupo. Fonte: do autor, 2017.

No teste de labirinto em Y (figura 6) apenas os animais controle demonstraram preferência por explorar o braço novo após duas horas da primeira exposição, analisado também por teste t de *Student* [$t(1,10) = -3,11$; $p=0,01$]. Sendo assim, apenas o grupo controle demonstrou estar com a memória espacial intacta, já os animais que receberam D-gal nas três doses apresentaram danos de memória espacial.

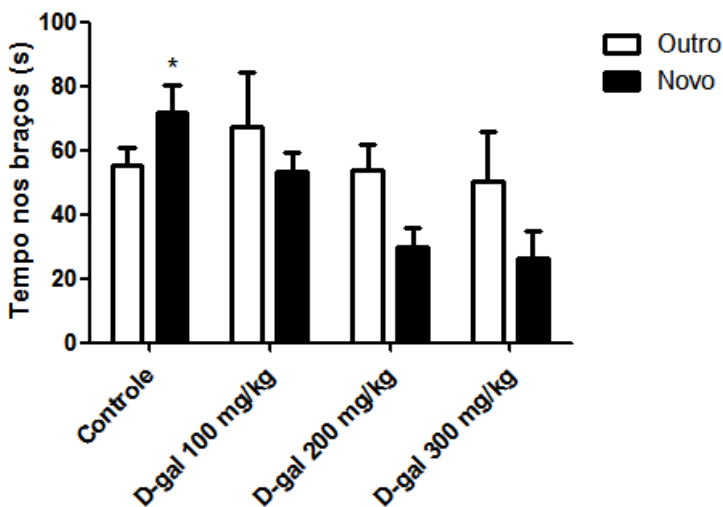


Figura 6 -Efeito da curva dose-resposta com D-gal via oral nas doses de 100, 200 e 300 kg/kg para indução do modelo animal de envelhecimento na memória espacial avaliada pelo teste de labirinto em Y.

O tempo de exploração em cada braço em segundos é apresentada como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado o braço “novo” com o braço “outro” do respectivo grupo. Fonte: do autor, 2017.

No teste de esquiwa inibitória (figura 7) foi observado o mesmo padrão de comportamento observado no teste de habituação ao campo aberto, sendo que os animais controle e os animais administrados com D-gal 300 mg/kg levaram mais tempo para descer da plataforma quando comparado ao treino, em todos os tempos de reexposição ao aparato, analisado pelo teste de Wilcoxon, quando avaliada a memória imediata (controle: $p=0,01$; D-gal 300 mg/kg: $p=0,01$), de curta duração (controle: $p=0,007$; D-gal 300 mg/kg: $p=0,01$), e de longa duração (controle: $p=0,007$; D-gal 300 mg/kg: $p=0,01$). Já os animais que receberam a dose de 100 mg/kg de D-gal apesar de levarem mais tempo para descer da plataforma nos 3 intervalos de tempo pós-choque (imediata: $p=0,007$; curta e longa: $p=0,01$), estes animais desceram da plataforma visivelmente mais rápido do que os animais controle nos 3 intervalos avaliados, e isso foi estatisticamente significativo utilizando o

teste de Kruskal-Wallis quando observada a memória de longa duração ($p= 0,04$). Este dado indicou prejuízo na memória aversiva já que os animais não lembravam que levaram o choque, e portanto, desceram mais rápido para a grade onde levaram o choque. Ainda, os animais que receberam a dose de 200 mg/kg tiveram a memória imediata e memória de longa duração reduzida quando comparado ao controle ($p=0,02$) e demonstraram dano na memória aversiva de curta duração ($p=0,11$). Estes dados indicam que os animais com D-gal 200 mg/kg apresentaram dano em todas as memórias aversivas: imediata, de curta e de longa duração.

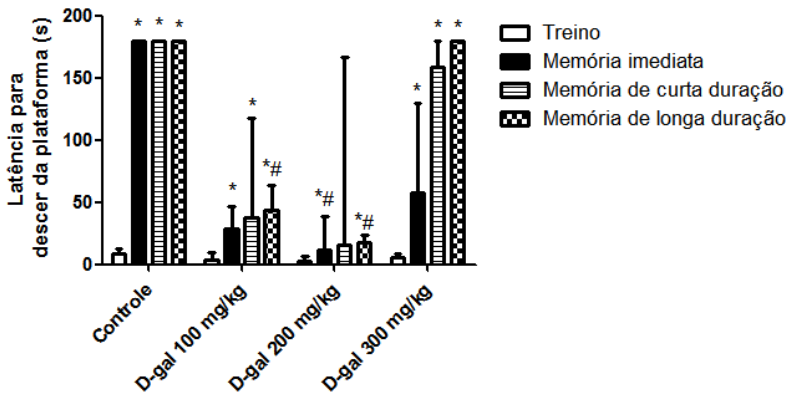


Figura 7 - Efeito da curva dose-resposta com D-gal via oral nas doses de 100, 200 e 300 kg/kg para indução do modelo animal de envelhecimento na memória aversiva avaliada pelo teste de esQUIVA inibitória.

A latência para descer da plataforma (segundos) é apresentada como mediana \pm intervalo interquartil de 10 animais por grupo. Foi avaliada memória imediata, memória de curta duração e a memória de longa duração. * $p<0,05$ comparado dentro de cada grupo com a sessão de treino e # $p<0,05$ comparado com o respectivo tipo de memória do grupo controle.

Fonte: do autor, 2017.

Considerando que a D-gal é um açúcar redutor e pode alterar as vias metabólicas dos animais, foi observado os níveis de glicose sanguínea, para avaliar se a D-gal pode alterar o metabolismo periférico da glicose, já que o envelhecimento envolve alteração metabólica da mesma. Para tanto, foram observados, nestes animais, os níveis glicêmicos ao final do

tratamento. De acordo com os resultados, não houve alteração da glicemia em nenhum grupo experimental analisado (Figura 8) ($p=0,98$).

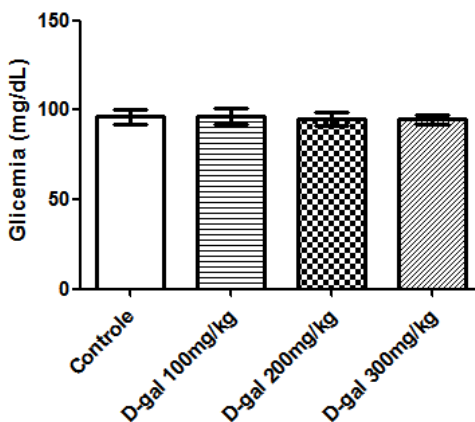


Figura 8 - Efeito da curva dose-resposta com D-gal via oral nas doses de 100, 200 e 300 kg/kg para indução do modelo animal de envelhecimento nos níveis de glicemia sanguínea.

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

Fonte: do autor, 2017.

De acordo com os resultados comportamentais avaliados até o momento, o dano de memória causado pela D-gal nas doses de 100 e 200 mg/kg foram similares, já que ambas causaram danos de memória de habituação, espacial e aversiva. Porém, o dano de memória aversiva ocasionado pela dose de 200 mg/kg foi mais expressivo, já que os animais apresentaram dano observável em todas as memórias aversivas, imediata, de curta e de longa duração. Com base nestes dados a dose de escolha para indução do modelo de envelhecimento induzido por D-gal, via oral, em animais com 2, 6 ou 16 meses e administrados com BS, foi a dose de 200 mg/kg.

4.2 AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE BS NO MODELO ANIMAL DE D-GAL EM ANIMAIS COM 2, 6 OU 16 MESES

Após a escolha da dose de D-gal (200 mg/kg) realizou-se a administração de BS em animais submetidos ao modelo animal de

envelhecimento induzido por D-gal com 2, 6 ou 16 meses de idade. Primeiramente foi observado o efeito da administração de BS no teste de campo aberto. Os resultados mostram que não houve alteração na locomoção desses animais [$F(1,10) = 1,63$; $p = 0,10$] no campo aberto quando analisados, os resultados, pela ANOVA de uma via entre os diferentes grupos experimentais (figura 9). Depois foi analisada memória de habituação ao campo aberto. Para tanto foi analisado em cada grupo experimental, através do teste t de *Student* a diferença entre o treino e teste. Os animais controle de 2 e 6 meses reduziram o número de cruzamentos (figura 9A) e levantamentos (figura 9B) (cruzamentos: $p = 0,01$ para as duas idades e levantamentos $p = 0,02$ e $p = 0,03$, para 2 e 6 meses, respectivamente) quando comparado treino e teste (24 horas após). Porém os animais de 16 meses de idade apresentaram dano na memória, uma vez que não reduziram o número de cruzamentos ($p = 0,65$) e levantamentos ($p = 0,62$) quando comparado ao treino. Estes achados indicam que este dado está relacionado ao dano cognitivo natural da idade. Os animais que foram administrados D-gal 200 mg/kg apresentaram dano de memória de habituação em todas as idades quando avaliado o número de cruzamentos (2 meses: $p = 0,59$; 6 meses: $p = 0,56$ e 16 meses: $p = 0,07$) e levantamentos (2 meses: $p = 0,07$; 6 meses: $p = 0,27$ e 16 meses: $p = 0,93$). Os animais controle tratados com BS não apresentaram danos na memória de habituação em nenhuma idade quando avaliado o número de cruzamentos (2 meses: $p = 0,01$; 6 meses: $p = 0,04$ e 16 meses: $p = 0,01$). Assim o BS conseguiu reverter o dano de memória próprio do envelhecimento (16 meses), quando avaliado o número de cruzamentos, mas não quando observados os números de levantamentos, os quais, apenas os animais de 2 meses ($p = 0,01$) e 6 meses ($p = 0,01$) aprenderam, mas não os de 16 meses ($p = 0,07$). Os animais administrados com D-gal e tratados com BS apresentaram reversão do dano causado pela D-gal em 2 meses quando avaliado o número de cruzamentos e levantamentos ($p < 0,01$), e também em 6 meses quando observado o número de cruzamentos ($p = 0,04$), mas não de levantamentos ($p = 0,27$), e não reverteu o dano de memória causado pela idade associado a administração de D-gal nos animais com 16 meses (cruzamentos e levantamentos: $p = 0,17$). Dessa forma, a D-gal causou danos na memória de habituação nos animais, como observado em animais com 2 meses, quando da realização da curva dose-reposta da D-gal, mas também em animais com 6 e 16 meses. O BS foi capaz de reverter parcialmente o dano de memória dependente da idade (16 meses) e reverter o dano ocasionado pela D-gal em 2 meses, parcialmente em 6 meses, mas não o dano de memória de habituação

causado pela D-gal associado ao envelhecimento de 16 meses. Assim, a associação da D-gal no envelhecimento parece ter exacerbado o dano cognitivo induzido pelo envelhecimento de 16 meses.

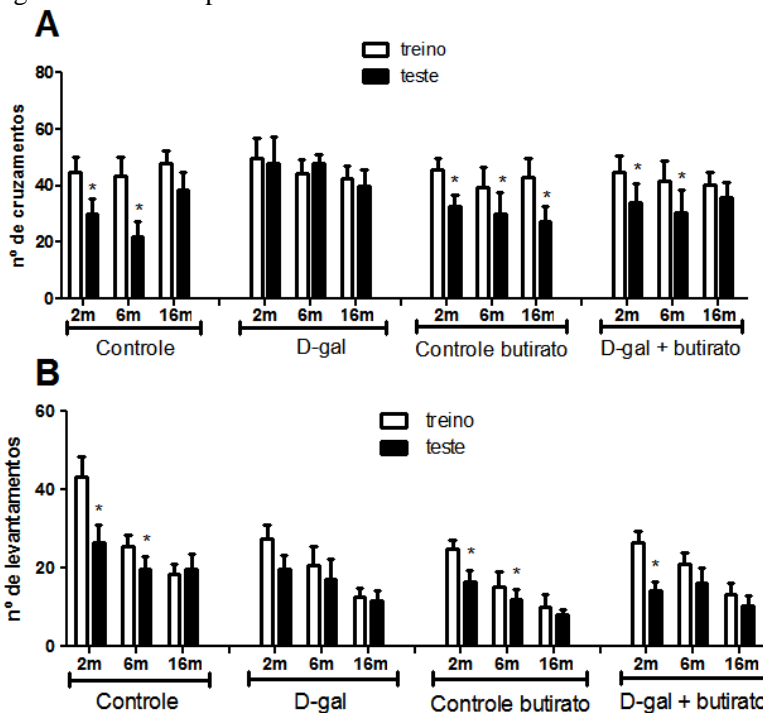


Figura 9 - Efeito do tratamento com butirato de sódio (BS) em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses na memória de habituação avaliada no campo aberto.

A figura mostra os resultados de cruzamentos (A) e levantamentos (B) dos animais no campo aberto. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado a sessão teste com a sessão treino do respectivo grupo.

Fonte: do autor, 2017.

O presente estudo avaliou o efeito do BS em animais com 2, 6 ou 16 meses e administrados com D-gal no teste do labirinto em Y ou *Y-maze*. Os resultados indicam que o teste t de *Student*, para amostras pareadas usado para avaliar os dados do labirinto em Y (figura 10), mostrou que apenas os animais controle de 2 meses exploraram mais o braço “novo” quando comparado ao “outro” [$t(1,9) = -3,11$; $p = 0,01$]. Os animais com 6

($p=0,57$) e 16 meses ($p=0,28$) de idade apresentaram danos de memória espacial, não reconhecendo o braço “novo”. A D-gal causou danos na memória espacial dos animais com 2 meses como já observado anteriormente ($p=0,11$), e em 6 e 16 meses ($p=0,55$ e $0,83$, respectivamente). Os animais com 2 meses tratados com BS também reconheceram o braço “novo” [$t(1,9)=-3,09915$; $p=0,02$], mas o BS não foi capaz de reverter o dano de memória espacial observado nos animais de 6 meses ($p=0,88$) e de 16 meses ($p=0,07$). Também não foi observada reversão pelo BS do dano de memória espacial causada pela D-gal nos animais com 2 ($p=0,05$), 6 ($p=0,11$) e 16 meses ($p=0,32$), uma vez que não houve diferença estatística entre o braço “outro” e o “novo”.

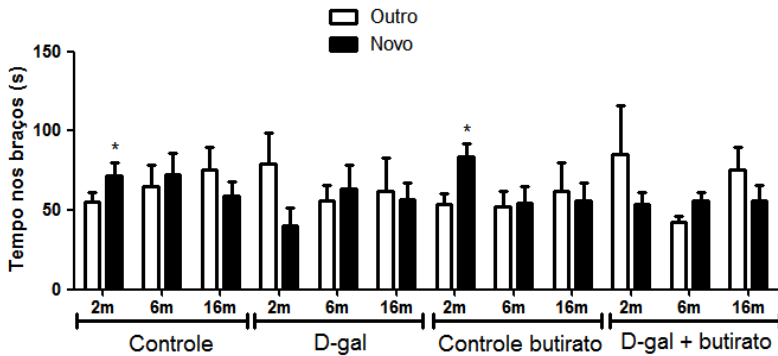


Figura 10 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses na memória espacial avaliada pelo teste de labirinto em Y.

O tempo de exploração em cada braço em segundos é apresentada como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. * $p<0,05$ quando comparado o braço “novo” com o braço “outro” do respectivo grupo. Fonte: do autor, 2017.

Quando avaliada a memória aversiva pelo teste de esquiava inibitória (figura 11), os resultados mostram que os animais controle de 2 e 6 meses aprenderam a tarefa, uma vez que demoraram mais para descer da plataforma em todos os tempos avaliados (5 segundos, 1,5 e 24 horas) após o treino (em que levaram choque), quando avaliado por Wilcoxon ($p=0,01$ para todos os tempos nas duas idades). Já os animais com 16 meses levaram mais tempo para descer da plataforma em 5 segundos ($p=0,02$), quando comparado ao treino. Porém eles desceram mais

rápido quando comparado com grupo de 2 meses, avaliado por Kruskal-Wallis mostrando redução de memória imediata ($p=0,03$). Os animais de 16 meses também apresentaram dano na memória aversiva de curta duração ($p=0,06$), aprendendo a tarefa apenas na memória de longa ($p=0,017$), pois apesar de levarem menos tempo que o controle 2 meses, isso não foi significativo ($p=0,63$). Estes dados mostram que os animais com 16 meses apresentaram dano na memória imediata e de curta duração. Os animais com 2 meses que receberam a D-gal mostraram dano em todas memórias avaliadas, porém na memória de longa duração o dano foi mais significativo pois o animal desceu em menor tempo comparado ao treino ($p=0,43$), porém mais rapidamente que os animais controle de 2 meses ($p=0,03$). Estes dados confirmam que os animais com 2 meses administrados com D-gal apresentam dano em todas as memórias aversivas. Os animais de 6 meses que receberam a D-gal tiveram dano apenas na memória imediata ($p=0,128$). Já os animais de 16 meses administrados com D-gal apresentaram dano na memória imediata e de curta duração como nos animais controle com 16 meses. Porém, a D-gal exacerbou o efeito do envelhecimento natural, já que ocasionou dano também na memória de longa duração ($p=0,79$) não observado no grupo controle de 16 meses. Quando os animais de todas idades foram tratados com BS não houve alteração na memória dos animais de 2 meses e 6 meses, sendo que todos continuaram com a mesma performance cognitiva do controle. Porém, foi observado reversão do dano de memória aversiva imediata e de curta duração induzida pelo envelhecimento natural em animais de 16 meses, ou seja, os animais administrados com BS levaram mais tempo para descer da plataforma ($p=0,017$) 5 segundos e 1,5 horas após o choque. Foi observado também o efeito do BS em animais com 2, 6 e 16 meses administrados com D-gal. BS induziu reversão do dano de memória imediata, de curta e de longa duração ($p=0,01$) causado pela D-gal em animais com 2 meses. BS também reverteu o dano causado pela D-gal na memória imediata ($p=0,005$) dos animais com 6 meses, e ainda, reverteu o dano de memória de curta duração ($p=0,01$) e de longa duração ($p=0,01$) causado em animais com 16 meses.

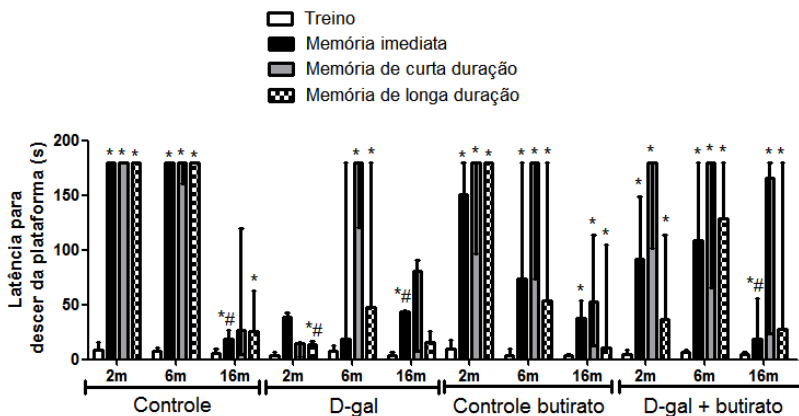


Figura 11 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses na memória aversiva avaliada pelo teste de esquiwa inibitória.

A latência para descer da plataforma (segundos) é apresentada como mediana \pm intervalo interquartil de 10 animais por grupo. Foi avaliada memória imediata, memória de curta duração e a memória de longa duração. * $p < 0,05$ comparado dentro de cada grupo com a sessão de treino e # $p < 0,05$ comparado com o respectivo tipo de memória do grupo controle de 2 meses.

Fonte: do autor, 2017.

Os resultados da avaliação da glicemia nos grupos após o tratamento com BS nas 3 idades utilizadas (figura 12), não foram modificados em nenhum grupo experimental ($p=0,08$).

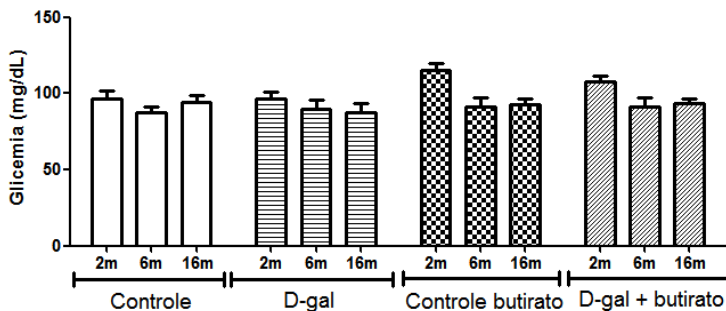


Figura 12 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses nos níveis de glicemia sanguínea.

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

Fonte: do autor, 2017.

Os resultados mostram a atividade da HDAC (figura 13) no córtex frontal e hipocampo dos animais administrados com BS e submetidos ao modelo de envelhecimento induzido pela D-gal em animais com 2, 6 ou 16 meses. A atividade da HDAC não foi alterada nos animais de 2 meses entre o controle e tratamento ($F=0,02$; $p=0,86$), nem nos animais de 6 meses ($F=1,22$; $p=0,29$) no córtex frontal (figura 13A), quando analisados separadamente, em cada idade. Apesar disso, foi observado que houve uma redução dependente da idade na atividade das HDACs em todos os grupos de 6 meses quando comparado aos animais de 2 meses ($p<0,05$). Nos animais de 16 meses, houve interação ($F=8,41$; $p=0,01$), sendo que, a D-gal causou aumento na atividade dessas enzimas ($p<0,01$) e o BS reduziu esse aumento ($p=0,01$) comparado ao grupo D-gal, porém não retornou aos níveis do controle. E também foi observado redução da atividade dependente da idade no controle e controle BS, comparado ao controle 2 meses. Assim, o envelhecimento normal e a D-gal parecem exercer efeitos opostos quando avaliado a atividade da HDAC.

No hipocampo (figura 13B) houve redução significativa ($F=5,64$; $p=0,03$) da atividade da HDAC nos animais de 2 meses tratados com BS tanto no grupo controle BS ($p=0,03$) quanto no grupo D-gal ($p<0,001$)

quando comparado ao controle. Nos animais de 6 meses houve uma redução da atividade das HDACs dependente da idade quando comparado aos animais de 2 meses, no controle ($p < 0,001$), D-gal ($p < 0,01$) e uma redução ainda maior quando esses animais foram tratados com BS tanto com ou sem D-gal ($p < 0,001$). Já nos animais de 16 meses a idade também reduziu a atividade da enzima quando comparadas o controle ($p < 0,01$) e o BS ($p < 0,001$) com controle 2 meses. Porém a D-gal causou um grande aumento da atividade comparado ao controle da respectiva idade e ao controle com 2 meses ($p < 0,001$). O tratamento com BS reverteu parcialmente esse aumento ($p < 0,001$). Mostrando novamente que o envelhecimento natural e induzido por D-gal apresentam mecanismos de ação diferentes na atividade da HDAC. O BS parece modular esse efeito nos animais administrados com D-gal.

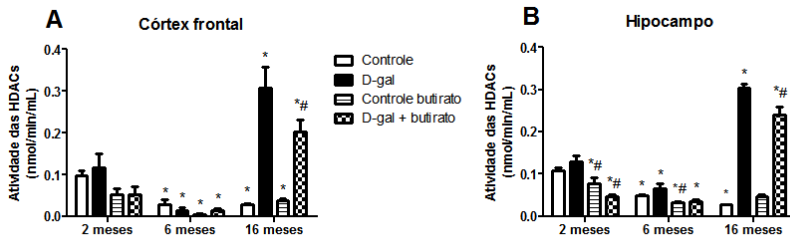


Figura 13 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses na atividade das histonas deacetilases (HDACs) no córtex frontal e hipocampo de ratos.

Os dados de atividade das HDACs no córtex frontal (A) e atividade das HDACs no hipocampo (B) são apresentados como média \pm erro padrão da média de 4-5 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle de 2 meses e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo D-gal da respectiva idade.

Fonte: do autor, 2017.

Também foi avaliado o dano ao DNA nesses animais utilizando o ensaio cometa (figura 14). Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias e mostraram que os animais com 2 meses tratados com D-gal tiveram uma maior frequência de danos (figura 14A) ao DNA quando comparado aos animais controle ($p < 0,01$) utilizando como fatores o modelo (D-gal) e o tratamento (BS) dentro da idade de 2 meses ($F = 22,80$; $p < 0,001$). Além disso, foi observado reversão desse dano pelo tratamento com BS ($p < 0,001$). A D-gal também causou danos ao DNA

em animais com 6 meses ($p < 0,001$). Porém, apesar da tendência a redução do dano observada após o tratamento com BS, essa reversão não foi significativa ($p = 0,05$). Nos animais de 16 meses controle houve um aumento do dano ao DNA ocasionado pela idade ($F = 6,78$; $p < 0,001$) comparado aos animais com 2 meses ($p = 0,04$), mas não nos tratados com D-gal ($p = 0,09$), além de não ter ocorrido reversão pelo tratamento com BS ($p = 0,55$). Quando avaliado o índice de dano (figura 14B), também foi observado que a D-gal aumentou os danos ao DNA ($F = 13,52$; $p < 0,001$) comparado ao controle nos animais de 2 meses ($p < 0,001$), e houve reversão desse dano com o tratamento com BS ($p = 0,01$). Nos animais de 6 meses também houve aumento de dano com a D-gal ($p < 0,001$) quando comparado com o controle de 2 meses. Os animais com 6 meses não tratados com D-gal não apresentaram dano. Além disso, foi observada reversão pelo BS ($p = 0,01$) do dano causado pela D-gal. Não houve alteração significativa no índice de danos nos animais com 16 meses.

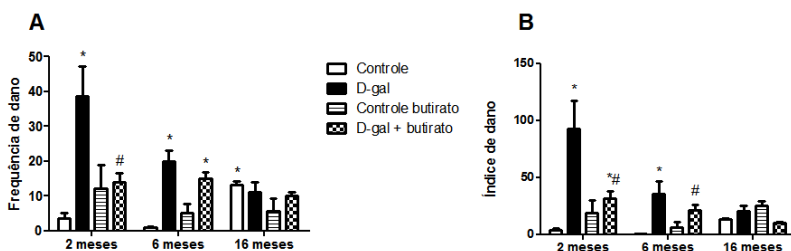


Figura 14 - Efeito do tratamento com butirato de sódio em animais induzidos ao modelo de envelhecimento por D-gal via oral (200 mg/kg) nas idades de 2, 6 e 16 meses nos danos ao DNA avaliados pelo ensaio cometa no sangue.

Os dados de frequência de dano (A) e índice de dano (B) são apresentados como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle de 2 meses e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo D-gal da respectiva idade. Fonte: do autor, 2017.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo inicialmente padronizou o modelo de envelhecimento induzido pela administração oral de D-gal por gavagem nas doses de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 300 mg/kg em ratos Wistar de 2 meses de idade. Na literatura o modelo de envelhecimento utilizando esse açúcar via sistêmica já foi bem descrito. Sabe-se que a administração sistêmica crônica de D-gal (intraperitoneal ou subcutânea) em roedores induz alterações de memória e moleculares como as observadas no envelhecimento natural (Kumar et al., 2009; Chen et al., 2010; Wu et al., 2012; Li et al., 2016; Yang et al., 2016) e doença de Alzheimer (DA) (Lu et al., 2010b; Gao et al., 2016).

Apesar do modelo animal induzido por D-gal já estar bem estabelecido na literatura, um estudo recente comparou a administração intraperitoneal e oral crônica de D-gal e demonstrou que, ao contrário da administração intraperitoneal, a via de administração oral pôde melhorar danos cognitivos em ratos submetidos a um modelo animal de DA (Salkovic-Petrisic et al., 2014). Portanto, existe controvérsia em torno do uso de D-gal por via oral. Já que em um outro estudo, do grupo de pesquisa que realizou este trabalho, observou que a administração oral de D-gal causou danos na memória espacial e danos oxidativos em ratos, bem como, uma redução nos níveis de proteínas estruturais no córtex frontal (Budni et al., 2015). Assim, o que difere se a D-gal via oral terá efeitos protetores ou irá induzir um modelo de envelhecimento pode ser a concentração.

O presente estudo utilizou as doses de 100, 200 ou 300 mg/kg/dia durante 30 dias. A dose de 100 mg e 200 mg causaram danos na memória de habituação, espacial e aversiva, porém, a dose de 200 mg/kg apresentou um dano ainda mais significativo que a dose de 100 mg na memória aversiva. A dose de 300 mg causou danos apenas na memória espacial. Assim, a dose de 200 mg parece ter sido mais eficaz em causar danos de memória nos animais. Esperava-se que a dose de 300 mg fosse mais tóxica, já que o excesso de D-gal no organismo leva a uma sobrecarga enzimática, levando ao aumento de galactitol pela enzima aldose redutase (Kaplan LA, 1997; Gitzelmann, 2000), causando danos de memória. Porém, nessa dose maior o organismo parece conseguir se adaptar a essa sobrecarga e o dano de memória não é mais observável. O mesmo foi observado no estudo de (Cardoso et al., 2015), o qual a dose de 300 mg/kg via intraperitoneal durante 8 semanas não ocasionou danos de memória nem alterou a neurogênese no hipocampo dos ratos.

O modelo de D-gal apesar de muito utilizado ainda é controverso, uma vez que o comprometimento da memória pode sofrer influência de sexo, idade, via de administração e tempo de tratamento e concentração de D-gal (Hao et al., 2014). Dessa forma, os dados disponíveis não são suficientes para se chegar a uma conclusão de tempo de tratamento, via de administração e concentração mais eficaz para o modelo de envelhecimento induzido por D-gal. Baseado nos resultados do presente estudo decidiu-se realizar essa padronização e utilizar a dose de escolha da D-gal (200 mg/kg) para obter um modelo confiável e, a partir dessa dose, utilizar o envelhecimento natural de ratos para comparar se o modelo de D-gal ocasiona os mesmos efeitos comportamentais e moleculares do envelhecimento natural em ratos de 2 meses, 6 meses ou 16 meses de idade.

Quando avaliado a memória de habituação dos animais de 2, 6 ou 16 meses de idade, observou-se que houve dano nessa memória apenas quando os animais completaram 16 meses, ou seja, dano pelo envelhecimento natural. Já os animais que receberam a D-gal apresentaram danos nas três idades. Na memória aversiva, animais com 16 meses (envelhecimento natural) apresentaram dano na memória imediata e de curta duração. A D-gal também causou danos em todas as memórias aversivas em animais com 2 meses e na memória imediata dos animais de 6 meses. A D-gal manteve o mesmo padrão de perda de memória imediata e de curta duração induzida pelo envelhecimento natural nos animais de 16 meses, porém na memória de longa duração apenas os animais de 16 meses tratados com D-gal apresentaram dano, indicando que a D-gal exacerbou o efeito do envelhecimento natural. Quando avaliada a memória espacial os animais de 6 meses e 16 meses apresentaram danos na memória, e os animais tratados com D-gal já apresentaram esse dano desde os 2 meses de idade. Em roedores já foi relatado que durante o envelhecimento natural ocorre declínio da memória de habituação (Deacon et al., 2009), memória aversiva (Lovatel et al., 2013) e das funções espaciais devido às alterações fisiológicas que ocorrem com o envelhecimento em diferentes regiões do cérebro, principalmente no hipocampo (Mora-Gallegos et al., 2015). No presente estudo, foi possível observar que a D-gal além de mimetizar o dano de memória ocasionado pelo envelhecimento já em animais com 2 meses, ela foi capaz de agravar o dano de memória dos animais em idades mais avançada, com 16 meses.

O envelhecimento em seres humanos é acompanhado por mudanças estruturais e neurofisiológicas no cérebro que causam graus variáveis de declínio cognitivo. Estudos de imagem funcional do cérebro humano

forneceram uma visão sem precedentes da atividade neural e como ela muda com o envelhecimento (Cabeza et al., 2002; Chow et al., 2017; Tian et al., 2017; Weiner et al., 2017). Ao nível histopatológico, ocorre perda neuronal, que é iniciada no córtex entorrinal, córtex pré-frontal e hipocampo, porém, essa perda neuronal não é considerada um preditor sensível para os danos de memória do envelhecimento (Rodrigue e Raz, 2004). O que mais está correlacionado ao dano cognitivo é a coordenação reduzida da atividade neuronal, que além de estar menos integrada está associada com mau desempenho em vários domínios cognitivos, assim, a atividade neuronal se torna menos localizada em algumas regiões cerebrais, particularmente no córtex pré-frontal, alterando tarefas de nível executivo (Park e Reuter-Lorenz, 2009). Com a idade ocorre uma mudança no padrão de atividade no hipocampo e córtex pré-frontal, estruturas que auxiliam no desempenho de tarefas cognitivas, e em função disso, o cérebro precisa se adaptar, através da neuroplasticidade. Porém há limites para essas adaptações, e o declínio cognitivo ocasionado pelo envelhecimento torna-se inevitável (Rajah et al., 2010).

Para que ocorra a neuroplasticidade é necessária a expressão de genes para síntese de proteínas responsáveis pela plasticidade sináptica, como fatores neurotróficos, fatores de crescimento, transportadores, proteínas sinápticas, cinases, fatores de transcrição e receptores (Yang e West, 2016; Forest et al., 2017; Singh e Thakur, 2017). Esses genes de plasticidade sináptica ajudam em diferentes estágios de formação e consolidação da memória (Maag et al., 2017). A redução da expressão destes genes no cérebro é um dos principais responsáveis pelo declínio da memória durante o envelhecimento, podendo estar relacionado também com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, porém não se sabe ao certo os mecanismos subjacentes à alteração da expressão gênica e o impacto disso na memória durante o envelhecimento.

Além da padronização da melhor dose de D-gal para causar maior efeito semelhante ao envelhecimento e avaliar o efeito desta em animais com diferentes idades (2, 6 ou 16 meses), o presente estudo visou investigar o papel da inibição das HDACs, através do uso de um inibidor de HDAC, BS, em animais com diferentes idades administrados ou não com D-gal. O BS foi capaz de reverter parcialmente o dano de memória em ratos com 16 meses no teste de habituação ao campo aberto, e reverter o dano causado pela D-gal totalmente nos animais com 2 e parcialmente nos animais com 6 meses. Porém, BS não foi capaz de reverter os danos de memória de habituação causados pelo envelhecimento nos animais de 16 meses, nem mesmo nos animais de

16 meses administrados com D-gal. Além disso, o BS foi capaz de reverter os danos de memória aversiva imediata e de curta duração observada nos animais de 16 meses. Além disso, BS foi capaz de melhorar a memória aversiva dos animais de 2, 6 e 16 meses administrados com D-gal. Porém, o BS não foi capaz de reverter os danos de memória espacial ocasionados pelo envelhecimento natural e pela D-gal ou pelo envelhecimento natural associado a D-gal.

A acetilação das histonas aumenta durante a codificação da memória em animais jovens saudáveis (Korzus et al., 2004; Fontán-Lozano et al., 2008). Por outro lado, a redução da acetilação de histonas em regiões promotoras específicas dos genes de animais envelhecidos reduz a expressão de proteínas de ativação imediata responsáveis pela plasticidade sináptica, incluindo os genes da proteína associada ao citoesqueleto regulada por atividade (Arc), proteína de resposta ao crescimento precoce 1 (EGR1), Homer1 e pentraxina regulada pela atividade neuronal (Narp). O tratamento com BS conseguiu reverter a redução da expressão dessas proteínas em ratos velhos de 20 meses, uma vez que reduziu a acetilação das histonas nas regiões promotoras H3K9 e H3K14. Além disso, o BS reduziu o dano de memória de reconhecimento de objeto nesses animais (Singh e Thakur, 2017).

Foi demonstrado que o aumento dos níveis de acetilação de histonas através do uso dos HDACis (tricostatina A ou BS) aumentou a potenciação de longa duração em sinapses da região CA1 do hipocampo, além de melhorar a formação de memória de longo prazo no teste de esQUIVA inibitória em ratos. Estes dados relacionam o aumento da acetilação com a formação da memória a longo prazo (Levenson et al., 2004). Vecsey et al. (2007) observaram que o tratamento com tricostatina A (HDACi) também melhorou a memória aversiva e isso foi mediado pela proteína de ligação ao elemento de resposta da adenosina monofosfato cíclica (CREB) no hipocampo. Esse conceito da inibição da acetilação das histonas, e a melhora da memória aversiva foi confirmado também por Bredy et al. (2007), que correlacionou esse aumento da acetilação e melhora da memória com o aumento da expressão de BDNF no córtex frontal. Além disso, foi demonstrado em ratos que o aumento da acetilação das histonas melhorou a memória de reconhecimento de locais e objetos (Scott et al., 2017). Outro estudo, utilizando o labirinto aquático e o teste de localização de objetos, em camundongos, mostrou que a redução da HDAC7 é envolvida na formação de memória dependente do hipocampo (Jing et al., 2017).

Assim, a inibição da acetilação das histonas mostrou ser crítica para a formação da memória aversiva e espacial (Guan et al., 2009),

corroborando com os achados do presente estudo. No entanto, no presente estudo não foi observada melhora da memória espacial no teste de labirinto em Y. Porém, além das diferenças metodológicas como a linhagem dos animais, o fármaco utilizado para inibição das HDACs, e o teste para avaliação da memória utilizado, o presente estudo utilizou animais envelhecidos e/ou submetidos ao modelo de D-gal, diferente dos estudos citados anteriormente que utilizaram animais jovens, sem danos cognitivos, apenas observando o reforço de memória ocasionado pela inibição das HDACs.

Ainda se tem poucos estudos sobre as alterações de memória, próprias do envelhecimento, e a relação com a acetilação de histonas. Sabe-se que a administração de HDACis (SAHA) foi capaz de restaurar a memória aversiva de animais de 16 meses de idade, pela inibição específica da histona 4 lisina 12 (H4K12) melhorando a expressão gênica e memória dos camundongos (Peleg et al., 2010). No envelhecimento natural uma injeção única de BS melhorou a consolidação da memória aversiva (Blank et al., 2015) e a memória de reconhecimento de objetos em ratos Wistar com 24 meses (Reolon et al., 2011). Em camundongos SAMP-8 com 8 meses de idade, o tratamento com uma única dose de BS antes do treinamento de reconhecimento de objetos melhorou a aquisição e consolidação da memória (Fontán-Lozano et al., 2008). Em camundongos envelhecidos pelo modelo de D-gal, a combinação de pyridoxine e BS aumentou a proliferação celular, a diferenciação de neuroblastos e melhorou a memória espacial desses animais avaliada pelo labirinto aquático (Yoo et al., 2012). No presente estudo, o BS não foi capaz de reverter o dano de memória espacial ocasionado pela D-gal nos animais, mas reverteu danos de memória de habituação e aversiva de animais envelhecidos e/ou submetidos ao modelo de envelhecimento induzido pela D-gal.

Outro parâmetro avaliado no presente estudo foi a atividade das HDACs em córtex frontal e hipocampo. Nos animais com 2 meses tratados com BS houve redução da atividade das enzimas no hipocampo. Houve também redução da atividade das enzimas no córtex dos animais de 6 meses, independente do tratamento, e também no hipocampo. Porém no hipocampo, os animais tratados com BS tiveram uma redução ainda mais significativa. Nos animais de 16 meses houve redução da atividade das HDACs nos animais controle e controle BS. Já a D-gal aumentou muito a atividade das enzimas tanto em córtex frontal quanto em hipocampo, e isso foi reduzido pelo tratamento com BS.

Ainda há poucos estudos sobre alterações das HDACs relacionadas com o envelhecimento, as quais desacetilam as histonas, reduzindo a

transcrição gênica. Alguns estudos relacionam a redução da acetilação com redução de proteínas ligadas a formação e consolidação da memória (Bredy et al., 2007; Guan et al., 2009; Jing et al., 2017; Scott et al., 2017). Foi observado aumento da expressão de HDAC2 no hipocampo, mas não no córtex, de camundongos Swiss de 20 meses, comparado com animais de 2 e 7,5 meses de idade (Singh e Thakur, 2014). E em um estudo mais recente Singh e Thakur (2017) observaram redução da acetilação das histonas H3K9 e H3K14 no hipocampo de camundongos de 7,5 e 20 meses, indicando que a atividade das HDACs poderia estar aumentada no envelhecimento, e o tratamento com BS conseguiu aumentar essa acetilação nos animais velhos. Porém, em outro estudo Peleg et al. (2010) não encontraram diferença na atividade das HDACs no hipocampo de camundongos de 16 meses comparado com 3 meses. Os autores justificam que a acetilação das histonas não depende apenas da atividade das HDACs (Peleg et al., 2010), mas também dos níveis de ATP-citrato-liase (LaClair et al., 2013), a enzima que converte o citrato derivado de glicose em acetil-CoA (Wellen et al., 2009). Sendo assim, a acetilação é dependente de citrato, o qual está reduzido no cérebro durante o envelhecimento (Peleg et al., 2010).

De qualquer forma, o consenso atual sobre alterações epigenéticas é que com o envelhecimento ocorre diminuição da acetilação de histonas e silenciamento de genes necessários para a memória. Porém, isso não é regra geral, uma vez que, o silenciamento da HDAC4 leva à senescência prematura em fibroblastos humanos. Além disso, foi observada que ocorre diminuição da expressão de HDAC4 no cérebro de camundongos SAMP8 de 8 meses (Han et al., 2016). Ainda, entre as HDACs, na classe das sirtuínas, a deficiência de SIRT6 em camundongos causa um fenótipo marcante, que inclui, instabilidade genômica, envelhecimento prematuro, e, em última análise, a morte de camundongos de aproximadamente 4 semanas de idade (Mostoslavsky et al., 2006). A falta de SIRT6 afeta o recrutamento de fatores de reparo importantes do DNA (Kaidi et al., 2010), e camundongos deficientes em SIRT6 apresentam danos no DNA particularmente no cérebro (Toiber et al., 2013). Foi observado que ratos velhos apresentam níveis reduzidos de SIRT6 em várias regiões cerebrais, inclusive no hipocampo (Braidly et al., 2015). A expressão de outra HDAC, a SIRT3 também se mostrou reduzida em córtex auditivo de ratos com 18 meses durante o envelhecimento natural (Zeng et al., 2014). Essa sirtuína está relacionada com a regulação da produção de EROs (Finley et al., 2011).

Dessa forma, os estudos com animais velhos não são conclusivos quanto as alterações na atividade das HDACs, uma vez que, é uma

numerosa família de enzimas, cada uma com diferentes peculiaridades e funções, e no presente estudo avaliou-se a atividade de todas HDACs sem distinção da classe. Além disso, no presente estudo as amostras foram retiradas dos animais que passaram pelo teste de esQUIVA inibitória. Sabe-se que esse teste pode aumentar a expressão de genes das HDAC 2 e 4 em animais jovens, mas não em animais de 16 meses (Peleg et al., 2010). Apesar do estudo citado não ter observado alteração na atividade das HDACs, no presente estudo a atividade das HDACs pode ter aumentado em decorrência do teste de esQUIVA inibitória apenas em animais de 2 meses, parecendo dessa forma estar reduzida em animais de 6 e 16 meses de idade. Porém, como não há animais não manipulados para comparar o efeito do comportamento na atividade das HDACs não se pode afirmar essa hipótese, sendo essa uma limitação do estudo. De qualquer forma, o presente estudo é o primeiro a observar a redução da atividade de HDACs causada pelo envelhecimento.

Outra observação importante foi que nos animais com 16 meses, a D-gal ocasionou um grande aumento na atividade das HDACs em ambas estruturas cerebrais. No estudo de Wu et al. (2015) não foi observada alteração nos níveis de SIRT1 avaliados por imuno-histoquímica, nos animais com 3 meses tratados com D-gal. Outro estudo observou redução da expressão de SIRT3 em córtex auditivo de ratos de 4, 10 e 18 meses tratados com D-gal (Zeng et al., 2014). Até o momento, nenhum outro estudo, além do presente, avaliou a atividade das HDACs em animais tratados com D-gal. Esse aumento tão exacerbado da atividade das HDACs nos animais pode em parte explicar o dano de memória ocasionado pela D-gal nos animais com 16 meses. Ainda, a redução da atividade das HDACs ocasionada pelo BS pode ter contribuído para melhorar a memória aversiva, uma vez que, essa redução pode estar ligada ao aumento da expressão de proteínas relacionadas a memória e plasticidade sináptica (Bredy et al., 2007; Guan et al., 2009; Jing et al., 2017; Scott et al., 2017).

O BS não inibe a atividade das HDACs de classe III nem as HDACs 6 e 10 da classe II (Davie, 2003). Possivelmente por esse motivo que a redução da atividade das HDACs pelo uso do medicamento foi significativamente diminuída apenas no hipocampo dos animais de 2 e 6 meses e nos animais tratados com D-gal e BS de 16 meses em ambas estruturas. Assim, a melhora pelo BS dos danos de memória causados pelo envelhecimento, não pode ser explicada apenas pela atividade das HDACs.

No presente estudo, avaliou-se também o dano ao DNA ocasionado pelo envelhecimento e/ou D-gal pelo ensaio cometa. A D-gal aumentou

a frequência e o índice de danos ao DNA nos animais de 2 e 6 meses de idade. Já o envelhecimento natural (animais de 16 meses) causou aumento apenas na frequência de dano ao DNA.

Uma das principais teorias do envelhecimento é o acúmulo de danos ao DNA que todas as células sofrem continuamente. Enquanto a maioria destes danos são reparados, alguns se acumulam quando mecanismos de reparo não conseguem reparar os danos na mesma velocidade com que são produzidos (Lenart e Krejci, 2016; Scheibye-Knudsen, 2016). Já foi demonstrado em outros estudos com roedores utilizando o ensaio cometa um aumento significativo no dano em DNA em leucócitos de camundongos velhos com 26 meses quando comparados aos jovens de 4 meses (Heuser et al., 2008), em cultura de fibroblastos de camundongos velhos (López-Diazguerrero et al., 2005). Além disso, há aumento no número de mutações e danos ao DNA, já bem descrito, em células estaminais hematopoiéticas e em células progenitoras causados pelo envelhecimento (Rossi et al., 2007; Beerman et al., 2014; Moehrle et al., 2015; Moehrle e Geiger, 2016). Estes estudos corroborando o presente estudo, no qual encontrou-se aumento na frequência de dano ao DNA em animais com 16 meses em sangue periférico.

Além disso, nos animais de 16 meses que receberam o tratamento com BS o aumento de danos ao DNA não foi observado, porém não se pode dizer que houve uma reversão total do dano ao DNA causados pelo envelhecimento nesses animais, já que também não foram observadas diferenças quando comparado o grupo controle 16 meses com o grupo tratado com BS de 16 meses. Pode-se falar em reversão parcial. A lesão do DNA pode causar apoptose, interferir no ciclo celular e causar senescência celular. O ensaio de cometa é amplamente aplicado à detecção de substâncias genotóxicas ou antígenotóxicas e pode ser útil para detecção de rupturas de cadeia simples e dupla, sítios alcalis-lábeis e ligações cruzadas (DNA-DNA ou DNA-proteína) (Singh et al., 1988). Embora o ensaio do cometa seja o método direto mais sensível para detectar danos ao DNA, sua sensibilidade é limitada (Pospelova et al., 2009), já que não é possível identificar outras alterações como por exemplo, modificações de reparo, modificações na cromatina ou na redução de telômeros, anteriores a ruptura de cadeias do DNA (Lenart e Krejci, 2016). Dessa forma, não se sabe o quanto o BS pode ter sido benéfico quanto a proteção contra outros danos ao DNA.

Outra teoria do envelhecimento relacionada a hipótese de danos ao DNA postula que os danos ao DNA provêm da produção de radicais livres, que oxidam o DNA, alterando a expressão gênica levando a senescência celular (Lipsky e King, 2015). Apesar disso ocorrer durante

toda a vida, com o passar do tempo de vida ocorre redução de proteínas de reparo, deixando a capacidade de reparo do DNA reduzida durante o envelhecimento. Isso foi confirmado por estudos os quais mostraram que o envelhecimento prematuro em camundongos com mutações genéticas, danificam a capacidade de reparo do DNA (Cao et al., 2003; Ruzankina et al., 2007; Vermeij et al., 2016).

Em um estudo anterior do grupo que realizou este trabalho, a administração de D-gal via oral causou aumento da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas no córtex frontal e hipocampo de ratos (Budni et al., 2015), o que pode estar relacionado com o aumento dos danos ao DNA observados no presente estudo após a administração de D-gal. Estudos anteriores demonstraram que a administração D-gal subcutânea aumentou os níveis de 8 hidroxidoxiguanosina (8-OHdG) no soro de camundongos com 2 meses, que é um marcador para danos ao DNA induzidos por EROs (Li et al., 2016). Outro estudo que utilizou injeções de D-gal subcutânea em ratos com 2-3 meses e encontrou aumento de NADPH oxidase e danos no DNA mitocondrial no hipocampo (Du et al., 2012) e também na parede lateral do ducto coclear de ratos tratados com D-gal (Wu et al., 2012). Estes estudos utilizaram animais jovens, e no presente estudo a indução do modelo de envelhecimento pela administração de D-gal conseguiu ocasionar danos ao DNA ainda maiores do que os observados em animais com 16 meses de idade, uma vez que no presente estudo o envelhecimento natural provocou apenas aumento na frequência de danos.

O BS conseguiu reduzir a frequência e índice de danos ao DNA ocasionada pela administração de D-gal nos animais de 2 e 6 meses de idade. Em um modelo de Parkinson induzido por alfa-sinucleína em células neuronais dopaminérgicas, o BS reduziu os danos ao DNA avaliados por ensaio cometa, além de aumentar a acetilação de H3 e regular positivamente genes envolvidos no reparo do DNA (Paiva et al., 2017). Outro estudo utilizou modelo de senescência induzido pela deficiência de metalopeptidase de zinco, homólogo de STE24 (Zmpste24) em camundongos e observou que o modelo induziu hipometilação de H4K16 e o tratamento com BS promoveu aumento da acetilação de H4K16, diminuiu a senescência celular, os danos ao DNA, além de aumentar o tempo de vida dos camundongos (Krishnan et al., 2011). Estes estudos mostram o efeito do BS em prevenir danos ao DNA pelo aumento da acetilação de histonas específicas, relacionando o efeito dessa proteção com a inibição das HDACs. Essa redução na atividade das HDACs foi observada no presente estudo, porém como citado anteriormente, no presente estudo não se pode afirmar ao certo

qual família de HDAC está envolvida na redução dos danos ao DNA observados.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a administração oral de D-gal pode mimetizar danos de memória em ratos similares aos observados no envelhecimento natural de ratos. Na curva dose-resposta realizada foi observado que as doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg de peso corporal foram mais eficazes em causar danos de memória nos animais do que a dose de 300 mg/kg. Com isso, utilizou-se a dose de 200 mg/kg para induzir senescência em ratos e comparar esse efeito em animais que envelheceram naturalmente. Os resultados mostraram que a D-gal via oral na dose de 200 mg/kg, além de causar danos de memória em animais com 2 meses, foi capaz de mimetizar os danos de memória observados em animais com 16 meses que envelheceram naturalmente e exacerbar o envelhecimento em animais com 16 meses.

O BS foi proposto no presente estudo como tratamento para melhorar a memória dos animais em diferentes idades, induzidos ao envelhecimento por administração de D-gal e/ou naturalmente. Os resultados foram positivos em relação ao uso do fármaco, sendo que este foi capaz de melhorar os danos de memória de habituação e aversiva causados pelo envelhecimento natural e/ou induzidos por D-gal. Dentre os mecanismos propostos para essa melhora, pode envolver a inibição da atividade das HDACs, que é o mecanismo de ação proposto do BS, porém, a melhora da memória não pôde ser explicada unicamente pela redução da atividade das HDACs, uma vez que essa redução, pelo BS, foi observada apenas nos animais com 16 meses e administrados com D-gal.

Da mesma forma, os danos ao DNA observados no ensaio cometa foram mais pronunciados nos animais que receberam a D-gal do que nos animais envelhecidos naturalmente, e o BS teve efeito benéfico reduzindo esses danos. O que explica em parte a reversão dos danos de memória causados pela D-gal, porém parcialmente os danos ocasionados pelo envelhecimento natural (animais com 16 meses), já que BS reverteu parcialmente a frequência de dano causada pelo envelhecimento natural. Contudo, o presente estudo fez novos achados que abrem caminho para a utilização do BS no envelhecimento. A ação de modulação epigenética do BS envolve mecanismos complexos. Os estudos nessa área ainda são recentes e estão em crescentes descobertas, mais estudos devem ser realizados para elucidar melhor os mecanismos específicos pelos quais o BS pode contribuir para melhoria da saúde mental e qualidade de vida durante o envelhecimento.

REFERÊNCIAS

Akiguchi I, Pallas M, Budka H, Akiyama H, Ueno M, Han J, Yagi H, Nishikawa T, Chiba Y, Sugiyama H, Takahashi R, Unno K, Higuchi K, Hosokawa M. SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2017.

Anand, KS, Dhikav, V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurolog*. 2012 Oct - Dec; 15(4): 239-246.
Bailón E, Cueto-Sola M, Utrilla P, Rodríguez-Cabezas ME, Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J, Comalada M. Butyrate in vitro immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. *Immunobiology*. 2010 Nov;215(11):863-73.

Beerman I, Seita J, Inlay MA, Weissman IL, Rossi DJ. Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell*. 2014 Jul 3;15(1):37-50.

Berdasco M, Esteller M. Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011. *Aging cell*. 2012;11(2):181-6.

Bird AD, Tan KH, Olsson PF, Zieba M, Flecknoe SJ, Liddicoat DR, Mollard R, Hooper SB, Cole TJ. Identification of glucocorticoid-regulated genes that control cell proliferation during murine respiratory development. *The Journal of physiology*. 2007;585(Pt 1):187-201.

Blank M, Dornelles AS, Werenicz A, Velho LA, Pinto DF, Fedi AC, Schroder N, Roesler R. Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*. 2014;111:1-8.

Blank M, Werenicz A, Velho LA, Pinto DF, Fedi AC, Lopes MW, Peres TV, Leal RB, Dornelles AS, Roesler R. Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats. *Neuroscience Letters*. 2015;594:76-81.

Borba Lde O, Guimaraes AN, Mazza Vde A, Maftum MA. [Mental health care based on the psychosocial model: reports of relatives and persons with mental disorders]. *Revista da Escola de Enfermagem da U S P*. 2012;46(6):1406-14.

Bousiges O, Vasconcelos AP, Neidl R, Cosquer B, Herbeaux K, Panteleeva I, Loeffler JP, Cassel JC, Boutillier AL. Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2010;35(13):2521-37.

Budni J, Pacheco R; Silva S; Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Medeiros J; Voss BC; Steckert AV; Valvassori SS; Quevedo J. Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. *Behavioral Brain Res*. 2016; 302 (2016) 35–43.

Budni J, Bellettini-Santos, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, GNF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis*. 2015 Oct1; 6(5): 331-41.

Budni J, Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, da Silva S, Luz APD, Schiavo GL, Batista-Silva H, Scaini G, Streck EL, Quevedo J. The oral administration of D-galactose induces abnormalities within the mitochondrial respiratory chain in the brain of rats. *Metabolic brain disease*. 2017;32(3):811-7.

Burke SN, Barnes CA. Neural plasticity in the ageing brain. *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7(1):30-40.

Butterfield DA, Poon HF. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*. 2005;40(10):774-83.

Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem*. 2007 Apr 6;14(4):268-76.

Brunet A, Berger SL. Epigenetics of aging and aging-related disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014; 69 Suppl 1:S17-20.

Cabeza R, Dolcos F, Graham R, Nyberg L. Similarities and differences in the neural correlates of episodic memory retrieval and working memory. *Neuroimage*. 2002 Jun;16(2):317-30.

Camelo S, Iglesias AH, Hwang D, Due B, Ryu H, Smith K, Gray SG, Imitola J, Duran G, Assaf B, Langley B, Khoury SJ, Stephanopoulos G, De Girolami U, Ratan RR, Ferrante RJ, Dangond F. Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. 2005;164(1-2):10-21.

Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodriguez MI, Acuna-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallas M. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mechanisms of ageing and development*. 2005;126(12):1300-4.

Cao S, Bendall H, Hicks GG, Nashabi A, Sakano H, Shinkai Y, Gariglio M, Oltz EM, Ruley HE. The high-mobility-group box protein SSRP1/T160 is essential for cell viability in day 3.5 mouse embryos. *Mol Cell Biol*. 2003 Aug;23(15):5301-7.

Cardoso A, Magano S, Marrana F, Andrade JP. D-Galactose High-Dose Administration Failed to Induce Accelerated Aging Changes in Neurogenesis, Anxiety, and Spatial Memory on Young Male Wistar Rats. *Rejuvenation Res*. 2015 Dec;18(6):497-507.

Castellano JF, Fletcher BR, Kelley-Bell B, Kim DH, Gallagher M, Rapp PR. Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. *PloS one*. 2012;7(3):e33249.

Castellano JF, Fletcher BR, Patzke H, Long JM, Sewal A, Kim DH, Kelley-Bell B, Rapp PR. Reassessing the effects of histone deacetylase inhibitors on hippocampal memory and cognitive aging. *Hippocampus*. 2014;24(8):1006-16.

Cesari M, Vellas B, Gambassi G. The stress of aging. *Exp Gerontol*. 2013;48(4):451-6.

Chang L, Liu X, Liu J, Li H, Yang Y, Liu J, Guo Z, Xiao K, Zhang C, Liu J, Zhao-Wilson X, Long J. D-galactose induces a mitochondrial complex I deficiency in mouse skeletal muscle: potential benefits of nutrient combination in ameliorating muscle impairment. *Journal of medicinal food*. 2014;17(3):357-64.

Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(50):19796-801.

Chen TF, Huang RF, Lin SE, Lu JF, Tang MC, Chiu MJ. Folic Acid potentiates the effect of memantine on spatial learning and neuronal protection in an Alzheimer's disease transgenic model. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;20(2):607-15.

Chow MS, Wu SL, Webb SE, Gluskin K, Yew DT. Functional magnetic resonance imaging and the brain: A brief review. *World J Radiol*. 2017 Jan 28;9(1):5-9.

Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2009;8(1):18-30.

Crowell CK, Qin Q, Grampp GE, Radcliffe RA, Rogers GN, Scheinman RI. Sodium butyrate alters erythropoietin glycosylation via multiple mechanisms. *Biotechnol Bioeng*. 2008 Jan 1; 99(1): 201-13.

Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long J, Packer L, Liu J. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *Journal of neuroscience research*. 2006;84(3):647-54.

Damaskos C, Valsami S, Kontos M, Spartalis E, Kalampokas T, Kalampokas E, Athanasiou A, Moris D, Daskalopoulou A, Davakis S, Tsourouflis G, Kontzoglu K, Perrea D, Nikiteas N, Dimitroulis D. Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2017; 37(1):35-46.

Davie JK, Edmondson DG, Coco CB, Dent SY. Tup1-S5n6 interacts with multiple class I histone deacetylase in vivo. *J Biol Chem*. 2003 Dec 12; 278(50):50158-62.

Deacon RM, Koros E, Bornemann KD, Rawlins JN. Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Behav Brain Res*. 2009 Feb 11; 197(2):466-8.

de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal*. 2003; 370(Pt 3):737-49.

de Vries CF, Staff RT, Harris SE, Chapko D, Williams DS, Reichert P, Ahearn T, McNeil CJ, Whalley LJ, Murray AD. Klotho, APOEepsilon4, cognitive ability, brain size, atrophy, and survival: a study in the Aberdeen Birth Cohort of 1936. *Neurobiology of aging*. 2017; 55:91-8.

Dellu F, Mayo W, Cherkaoui J, Le Moal M, Simon H. A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain research*. 1992; 588(1):132-9.

Didonna A, Opal P. The promise and perils of HDAC inhibitors in neurodegeneration. *Annals of clinical and translational neurology*. 2015; 2(1):79-101.

Du Z, Hu Y, Yang Y, Sun Y, Zhang S, Zhou T, Zeng L, Zhang W, Huang X, Kong W, Zhang H. NADPH oxidase-dependent oxidative stress and mitochondrial damage in hippocampus of D-galactose-induced aging rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2012 Aug; 32(4):466-72.

Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall NW, Ratan RR, Luthi-Carter R, Hersch SM. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003; 23(28):9418-27.

Ferreira RD, Silva PF, Garcia VA, Dornelles Ada S, Silva VK, Maurmann N, Portal BC, Piazza FC, Roesler R, Schröder N. Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced

H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. *Neuroscience*. 2012 Jan 3;200:42-9.

Fialova B, Luzna P, Gursky J, Langova K, Kolar Z, Trtkova KS. Epigenetic modulation of AR gene expression in prostate cancer DU145 cells with the combination of sodium butyrate and 5'-Aza-2'-deoxycytidine. *Oncol Rep*. 2016;36(4):2365-74.

Finley LW, Haas W, Desquiret-Dumas V, Wallace DC, Procaccio V, Gygi SP, Haigis MC. Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. *PLoS One*. 2011;6(8):e23295.

Fontán-Lozano A, Romero-Granados R, Troncoso J, Múnera A, Delgado-García JM, Carrión AM. Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Mol Cell Neurosci*. 2008 Oct;39(2):193-201.

Forest M, Iturria-Medina Y, Goldman JS, Kleinman CL, Lovato A, Oros Klein K, Evans A, Ciampi A, Labbe A, Greenwood CMT. Gene networks show associations with seed region connectivity. *Hum Brain Mapp*. 2017 Jun;38(6):3126-40.

Fujimaki S, Wakabayashi T, Takemasa T, Asashima M, Kuwabara T. The regulation of stem cell aging by Wnt signaling. *Histology and histopathology*. 2015:11657.

Gao L, Peng XM, Huo SX, Liu XM, Yan M. Memory Enhancement of Acteoside (Verbascoside) in a Senescent Mice Model Induced by a Combination of d-gal and AICl3. *Phytotherapy research : PTR*. 2015;29(8):1131-6.

Giltzman R, Kolosha V, Anoaia E, Cespedes C, Shih L, Casco T, Saborio M, Trejos R, Buist N, Tedesco T, Skach W, Mitelmann O, Ledee, Huang, DK and Stambolian D. Novel Mutations in 13 Proband With Galactokinase Deficiency. *Human Mutation*. 2000;15:447-53.

Gooney M, Messaoudi E, Maher FO, Bramham CR, Lynch MA. BDNF-induced LTP in dentate gyrus is impaired with age: analysis of changes in cell signaling events. *Neurobiol Aging*. 2004;25(10):1323-31.

Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai LH. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009 May 7;459(7243):55-60.

Han X, Niu J, Zhao Y, Kong Q, Tong T, Han L. HDAC4 stabilizes SIRT1 via sumoylation SIRT1 to delay cellular senescence. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016 Jan;43(1):41-6.

Hao L, Huang H, Gao J, Marshall C, Chen Y, Xiao M. The influence of gender, age and treatment time on brain oxidative stress and memory impairment induced by D-galactose in mice. *Neurosci Lett*. 2014 Jun 13;571:45-9.

He M, Liu MY, Wang S, Tang QS, Yao WF, Zhao HS, Wei MJ. Research on EGCG improving the degenerative changes of the brain in AD model mice induced with chemical drugs. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = J Chinese Med Mat*. 2012; 35:1641-1644.

Heuser UD, 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 Oct; 32(10): 1223-9.

Hsieh H-M, Wu W-M, Hu M-L. Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF- κ B binding activity in neuronal PC12 cells. *Life Sciences*. 2011;88(1-2):82-8.

Hsieh HM, Wu WM, Hu ML. Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2009;47(3):625-32.

Ismail Z, Nguyen MQ, Fischer CE, Schweizer TA, Mulsant BH, Mamo D. Neurobiology of delusions in Alzheimer's disease. *Curr Psychiatry Rep*. 2011;13(3):211-8.

Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Madruga M, Medina JH.

Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behavioural pharmacology*. 1998;9(5-6):421-7.

Jing X, Sui WH, Wang S, Xu XF, Yuan RR, Chen XR, Ma HX, Zhu YX, Sun JK, Yi F, Chen ZY, Wang Y. HDAC7 Ubiquitination by the E3 Ligase CBX4 Is Involved in Contextual Fear Conditioning Memory Formation. *J Neurosci*. 2017 Apr 5;37(14):3848-3863.

Jurgens HA, Johnson RW. Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Experimental neurology*. 2012;233(1):40-8.

Kaidi A, Weinert BT, Choudhary C, Jackson SP. Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science*. 2010 Sep 10;329(5997):1348-53.

Kaplan LA. Introduction and summary: 1996 NACB Standard of Laboratory Practice. *Clin Chem*. 1997 Jan; 43(1): 202-04.

Kolosha V, Anoaia E, de Cespedes C, Gitzelmann R, Shih L, Casco T, Saborio M, Trejos R, Buist N, Tedesco T, Skach W, Mitelmann O, Ledee D, Huang K, Stambolian D. Novel mutations in 13 probands with galactokinase deficiency. *Human mutation*. 2000;15(5):447-53.

Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*. 2004 Jun 24;42(6):961-72.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.

Krishnan V, Chow MZ, Wang Z, Zhang L, Liu B, Liu X, Zhou Z. Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 26;108(30):12325-30.

Kumar A, Dogra S, Prakash A. Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against D-galactose induced senescence in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2009;380(5):431-41.

Kumar MJ, Ponvijay KS, Nandhini R, Nagarajan RS, Jose J, Srinivas G, Nagarajan P, Venkatesan R, Kumar K, Singh S. A mouse model for luminal epithelial like ER positive subtype of human breast cancer. *BMC Cancer*. 2007 Sep 20;7:180.

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45-51.

Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science (New York, NY)*. 2005;309(5742):1829-33.

LaClair KD, Manaye KF, Lee DL, Allard JS, Savonenko AV, Troncoso JC, Wong PC. Treatment with bexarotene, a compound that increases apolipoprotein-E, provides no cognitive benefit in mutant APP/PS1 mice. *Molecular neurodegeneration*. 2013;8:18.

Lenart P, Krejci L. DNA, the central molecule of aging. *Mutation research*. 2016;786:1-7.

Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(39):40545-59.

Li J, Cai D, Yao X, Zhang Y, Chen L, Jing P, Wang L, Wang Y. Protective Effect of Ginsenoside Rg1 on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells through Attenuating Oxidative Stress and the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in a Mouse Model of d-Galactose-induced Aging. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(6):849.

Lipsky MS, King M. Biological theories of aging. *Disease-a-month : DM*. 2015;61(11):460-6.

Liu HW, Chan YC, Wang MF, Wei CC, Chang SJ. Dietary (-)-Epigallocatechin-3-gallate Supplementation Counteracts Aging-

Associated Skeletal Muscle Insulin Resistance and Fatty Liver in Senescence-Accelerated Mouse. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(38):8407-17.

López-Diazguerrero NE, Luna-López A, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella A, Königsberg M. Susceptibility of DNA to oxidative stressors in young and aging mice. *Life sciences*. 2005;77(22):2840-54.

López-León M, Goya RG. The Emerging View of Aging as a Reversible Epigenetic Process. *Gerontology*. 2017.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153(6):1194-217.

Lovatel GA, Elsner VR, Bertoldi K, Vanzella C, Moysés FdS, Vizueté A, Spindler C, Cechinel LR, Netto CA, Muotri AR, Siqueira IR. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*. 2013;101:94-102.

Lu J, Wu D-m, Hu B, Cheng W, Zheng Y-l, Zhang Z-f, Ye Q, Fan S-h, Shan Q, Wang Y-j. Chronic administration of troxerutin protects mouse brain against d-galactose-induced impairment of cholinergic system. *Neurobiology of learning and memory*. 2010a;93(2):157-64.

Lu J, Wu DM, Hu B, Cheng W, Zheng YL, Zhang ZF, Ye Q, Fan SH, Shan Q, Wang YJ. Chronic administration of troxerutin protects mouse brain against D-galactose-induced impairment of cholinergic system. *Neurobiology of learning and memory*. 2010b;93(2):157-64.

Luceri C, Femia AP, Fazi M, Di Martino C, Zolfanelli F, Dolara P, Tonelli F. Effect of butyrate enemas on gene expression profiles and endoscopic/histopathological scores of diverted colorectal mucosa: A randomized trial. *Dig Liver Dis*. 2016; 48(1):27-33.

Maag JL, Kaczorowski DC, Panja D, Peters TJ, Bramham CR, Wibrand K, Dinger ME. Widespread promoter methylation of synaptic plasticity genes in long-term potentiation in the adult brain in vivo. *BMC genomics*. 2017;18(1):250.

Machado-Vieira R, Ibrahim L, Zarate CA Jr. Histone Deacetylases and Mood Disorders: Epigenetic Programming in Gene-Environment Interactions. *CNS Neurosci Ther.* 2011; 17(6):699-704.

Maciel-Baron LA, Moreno-Blas D, Morales-Rosales SL, Gonzalez-Puertos VY, Lopez-Diazguerrero NE, Torres C, Castro-Obregon S, Konigsberg M. Cellular senescence, neurological function and redox state. *Antioxidants & redox signaling.* 2017.

Malvaez M, Sanchis-Segura C, Vo D, Lattal KM, Wood MA. Modulation of chromatin modification facilitates extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Biol Psychiatry.* 2010; 67(1):36-3.

Mendelsohn AR, Larrick JW. Epigenetic-mediated decline in synaptic plasticity during aging. *Rejuvenation research.* 2012;15(1):98-101.

Moehrle BM, Geiger H. Aging of hematopoietic stem cells: DNA damage and mutations? *Experimental Hematology.* 2016;44(10):895-901.

Moehrle BM, Nattamai K, Brown A, Florian MC, Ryan M, Vogel M, Bliederaeuser C, Soller K, Prows DR, Abdollahi A, Schleimer D, Walter D, Milsom MD, Stambrook P, Porteus M, Geiger H. Stem Cell-Specific Mechanisms Ensure Genomic Fidelity within HSCs and upon Aging of HSCs. *Cell reports.* 2015;13(11):2412-24.

Mora-Gallegos A, Rojas-Carvajal M, Salas S, Saborío-Arce A, Fornaguera-Trías J, Brenes JC. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry. *Neurobiology of learning and memory.* 2015;118:96-104.

Morley JE, Farr SA, Kumar VB, Armbrecht HJ. The SAMP8 mouse: a model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Current pharmaceutical design.* 2012;18(8):1123-30.

Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Frenthewey D, Auerbach W, Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO, Hursting S, Barrett JC, Guarente L, Mulligan R, Demple

B, Yancopoulos GD, Alt FW. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006;124(2):315-29.

Murugan K, Sangeetha S, Ranjitha S, Vimala A, Al-Sohaibani S, Rameshkumar G. HDACiDB: a database for histone deacetylase inhibitors. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:2257-64.

Nagai T, Yamada K, Kim HC, Kim YS, Noda Y, Imura A, Nabeshima Y, Nabeshima T. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(1):50-2.

Ni YF, Wang J, Yan XL, Tian F, Zhao JB, Wang YJ, Jiang T. Histone deacetylase inhibitor, butyrate, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Respir Res*. 2010 Mar 20;11:33.

Oh G, Ebrahimi S, Wang SC, Cortese R, Kaminsky ZA, Gottesman II, Burke JR, Plassman BL, Petronis A. Epigenetic assimilation in the aging human brain. *Genome Biol*. 2016;17:76.

Ohira H, Fujioka Y, Katagiri C, Mamoto R, Aoyama-Ishikawa M, Amako K, Izumi Y, Nishiumi S, Yoshida M, Usami M, Ikeda M. Butyrate attenuates inflammation and lipolysis generated by the interaction of adipocytes and macrophages. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(5):425-42.

ONU, United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). *World Population Ageing 2015 (ST/ESA/SER.A/390)*.

ONU, United Nations. *World Population Ageing 2013 [Internet]*. New York, USA: Department of Economic and Social Affairs, Population Division; 2013. Report No.: ST/ESA/SER.A/348. Available: <http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WorldPopulationAgeing2013.pdf>.

Ota K, Oishi N, Ito K, Fukuyama H. Effects of imaging modalities, brain atlases and feature selection on prediction of Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience methods*. 2015.

Paiva I, Pinho R, Pavlou MA, Hennion M, Wales P, Schutz AL, Rajput A, Szego E, Kerimoglu C, Gerhardt E, Cristina Rego A, Fischer A, Bonn S, Outeiro TF. Sodium Butyrate Rescues Dopaminergic Cells from Alpha-Synuclein-Induced Transcriptional Deregulation and Dna damage. *Human molecular genetics*. 2017.

Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM. Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochemistry international*. 2011;58(4):447-57.

Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiology & behavior*. 2000;68(4):509-14.

Park DC, Reuter-Lorenz P. The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annual review of psychology*. 2009;60:173-96.

Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science (New York, NY)*. 2010;328(5979):753-6.

Pospelova TV, Demidenko ZN, Bukreeva EI, Pospelov VA, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2009;8(24):4112-8.

Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Negri J, McMullan C, Miller JW, Marks PA, Mitsiades N. Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human retinoblastoma cell lines: clinical implications. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(9):4072-9.

Pourmemar E, Majdi A, Haramshahi M, Talebi M, Karimi P, Sadigh-Eteghad S. Intranasal Cerebrolysin Attenuates Learning and Memory Impairments in D-galactose-Induced Senescence in Mice. *Experimental gerontology*. 2017;87, Part A:16-22.

Prisila Dulcy C, Singh HK, Preethi J, Rajan KE. Standardized extract of *Bacopa monniera* (BESEB CDRI-08) attenuates contextual associative learning deficits in the aging rat's brain induced by D-galactose. *J Neurosci Res.* 2012;90(10):2053-64.

Qin RA, Yao XX, Huang ZY. Effects of compound danshen tablets on spatial cognition and expression of brain beta-amyloid precursor protein in a rat model of Alzheimer's disease. *J Tradit ChinMed.* 2012; 32:63–6.
Rajah MN, Kromas M, Han JE, Pruessner JC. Group differences in anterior hippocampal volume and in the retrieval of spatial and temporal context memory in healthy young versus older adults. *Neuropsychologia.* 2010;48(14):4020-30.

Rando TA, Chang HY. Aging, Rejuvenation, and Epigenetic Reprogramming: Resetting the Aging Clock. *Cell.* 2012; 148(1-2): 46–57.

Reolon GK, Maurmann N, Werenicz A, Garcia VA, Schroder N, Wood MA, Roesler R. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behavioural brain research.* 2011;221(1):329-32.

Rodrigue KM, Raz N. Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2004;24(4):956-63.

Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature.* 2007;447(7145):725-9.

Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, Cotsarelis G, Zediak VP, Velez M, Bhandoola A, Brown EJ. Deletion of the Developmentally Essential Gene *ATR* in Adult Mice Leads to Age-Related Phenotypes and Stem Cell Loss. *Cell stem cell.* 2007;1(1):113-26.

Säemann MD, Böhmig GA, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, Stöckl J, Hörl WH, Zlabinger GJ. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* 2000 Dec;14(15):2380-2.

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

Sanderson WC, Scherbov S. Faster increases in human life expectancy could lead to slower population aging. *PLoS One*. 2015; 15;10(4):e0121922.

Scheibye-Knudsen M. Neurodegeneration in accelerated aging. *Danish medical journal*. 2016;63(11).

Scott H, Smith AE, Barker GR, Uney JB, Warburton EC. Contrasting roles for DNA methyltransferases and histone deacetylases in single-item and associative recognition memory. *Neuroepigenetics*. 2017;9:1-9.

Sharma S, Taliyan R, Singh S. Beneficial effects of sodium butyrate in 6-OHDA induced neurotoxicity and behavioral abnormalities: Modulation of histone deacetylase activity. *Behavioural Brain Research*. 2015;291:306-14.

Shen H, Wang J, Jiang D, Xu P, Zhu X, Zhang Y, Yu X, Won MH, Su PQ, Yan BC. Topiramate Improves Neuroblast Differentiation of Hippocampal Dentate Gyrus in the D-Galactose-Induced Aging Mice via Its Antioxidant Effects. *Cellular and molecular neurobiology*. 2016.

Simões, CCS. Relações entre as alterações históricas na dinâmica demográfica brasileira e os impactos decorrentes do processo de envelhecimento da população. Rio de Janeiro : IBGE, Coordenação de População e Indicadores Sociais, 2016.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.

Singh P, Thakur MK. Reduced recognition memory is correlated with decrease in DNA methyltransferase1 and increase in histone deacetylase2 protein expression in old male mice. *Biogerontology*. 2014;15(4):339-46.

Singh P, Thakur MK. Histone Deacetylase 2 Inhibition Attenuates Downregulation of Hippocampal Plasticity Gene Expression during Aging. *Mol Neurobiol*. 2017.

Siqueira IR, Cimarosti H, Fochesatto C, Salbego C, Netto CA. Age-related susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. *Brain Res*. 2004;1025(1-2):226-30.

Siqueira IR, Fochesatto C, de Andrade A, Santos M, Hagen M, Bello-Klein A, Netto CA. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2005;23(8):663-71.

Steckert AV, Comim CM, Igna DMD, Domingui D, Mendonça BP, Ornell F, Colpo GD, Gubert C, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Effects of sodium butyrate on aversive memory in rats submitted to sepsis. *Neuroscience Letters*. 2015;595:134-8.

Sunley K; Butler, M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. *Biotechnol Adv*. 2010; 28: 385-394.

Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I, Katoh H. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Archives of gerontology and geriatrics*. 1994;19(2):185-92.

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev*. 2008;59(1):201-20.

Tazkarji B, Lam R, Lee S, Meiyappan S. Approach to preventive care in the elderly. *Can Fam Physician*. 2016 Sep;62(9):717-21.

Tian Q, Chastan N, Bair WN, Resnick SM, Ferrucci L, Studenski SA. The brain map of gait variability in aging, cognitive impairment and dementia-A systematic review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2017;74(Pt A):149-62.

Toiber D, Erdel F, Bouazoune K, Silberman DM, Zhong L, Mulligan P, Sebastian C, Cosentino C, Martinez-Pastor B, Giacosa S, D'Urso A,

Näär AM, Kingston R, Rippe K, Mostoslavsky R. SIRT6 recruits SNF2H to sites of DNA breaks, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Molecular cell*. 2013;51(4):454-68.

Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell*. 2002;111(3):285-91.

Valvassori SS, Resende WR, Budni J, Dal-Pont GC, Bavaresco DV, Reus GZ, Carvalho AF, Goncalves CL, Furlanetto CB, Streck EL, Quevedo J. Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, reverses behavioral and mitochondrial alterations in animal models of depression induced by early- or late-life stress. *Current neurovascular research*. 2015.

Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T, Wood MA. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(23):6128-40.

Vermeij WP, Dolle ME, Reiling E, Jaarsma D, Payan-Gomez C, Bombardieri CR, Wu H, Roks AJ, Botter SM, van der Eerden BC, Youssef SA, Kuiper RV, Nagarajah B, van Oostrom CT, Brandt RM, Barnhoorn S, Imholz S, Pennings JL, de Bruin A, Gyenis A, Pothof J, Vijg J, van Steeg H, Hoeijmakers JH. Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNA-repair-deficient mice. *Nature*. 2016;537(7620):427-31.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem*. 2000;7(5):333-40

Waggoner D. Mechanisms of disease: epigenesis. *Seminars in pediatric neurology*. 2007;14(1):7-14.

Walsh ME, Bhattacharya A, Sataranatarajan K, Qaisar R, Sloane L, Rahman MM, Kinter M, Van Remmen H. The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. *Aging cell*. 2015.

Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. Ageing research reviews. 2009;8(1):43-51.

Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC, Harvey D, Jack CR, Jr., Jagust W, Morris JC, Petersen RC, Saykin AJ, Shaw LM, Toga AW, Trojanowski JQ. Recent publications from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Reviewing progress toward improved AD clinical trials. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association.* 2017.

Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science (New York, NY).* 2009;324(5930):1076-80.

Wu H, Wang H, Zhang W, Wei X, Zhao J, Yan P, Liu C. rhEPO affects apoptosis in hippocampus of aging rats by upregulating SIRT1. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.* 2015;8(6):6870-80.

Wu L, Sun Y, Hu Y-J, Yang Y, Yao L-L, Zhou X-X, Wang H, Zhang R, Huang X, Kong W-J. Increased p66Shc in the Inner Ear of D-Galactose-Induced Aging Mice with Accumulation of Mitochondrial DNA 3873-bp Deletion: p66Shc and mtDNA Damage in the Inner Ear during Aging. *PloS one.* 2012;7(11):e50483.

Wu Y, Hou F, Wang X, Kong Q, Han X, Bai B. Aberrant Expression of Histone Deacetylases 4 in Cognitive Disorders: Molecular Mechanisms and a Potential Target. *Frontiers in molecular neuroscience.* 2016;9:114.

Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(45):38029-34.

Yancopoulos GD, Alt FW. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006;124(2):315-29.

Yang H, Qu Z, Zhang J, Huo L, Gao J, Gao W. Ferulic acid ameliorates memory impairment in d-galactose-induced aging mouse model. *International journal of food sciences and nutrition.* 2016;67(7):806-17.

Yang MG, West AE. Editing the Neuronal Genome: a CRISPR View of Chromatin Regulation in Neuronal Development, Function, and Plasticity. *The Yale journal of biology and medicine*. 2016;89(4):457-70.

Yang W, Shi L, Chen L, Zhang B, Ma K, Liu Y, Qian Y. Protective effects of perindopril on d-galactose and aluminum trichloride induced neurotoxicity via the apoptosis of mitochondria-mediated intrinsic pathway in the hippocampus of mice. *Brain Res Bull*. 2014;109:46-53.

Yoo DY, Kim W, Kim IH, Nam SM, Chung JY, Choi JH, Yoon YS, Won MH, Hwang IK. Combination effects of sodium butyrate and pyridoxine treatment on cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus of D-galactose-induced aging model mice. *Neurochemical research*. 2012;37(1):223-31

Yoo DY, Kim DW, Kim MJ, Choi JH, Jung HY, Nam SM, Kim JW, Yoon YS, Choi SY, Hwang IK. Sodium butyrate, a histone deacetylase Inhibitor, ameliorates SIRT2-induced memory impairment, reduction of cell proliferation, and neuroblast differentiation in the dentate gyrus. *Neurological research*. 2015;37(1):69-76.

Yu N, Liu J, Yi G, Ye F, Xiao J, Guo F. DNA methylation is necessary for erythropoietin to improve spatial learning and memory in SAMP8 mice. *Experimental gerontology*. 2015a;69:111-5.

Yu Y, Bai F, Wang W, Liu Y, Yuan Q, Qu S, Zhang T, Tian G, Li S, Li D, Ren G. Fibroblast growth factor 21 protects mouse brain against d-galactose induced aging via suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2015b;133:122-31.

Zeng J, Libien J, Shaik F, Wolk J, Hernández AI. Nucleolar PARP-1 Expression Is Decreased in Alzheimer's Disease: Consequences for Epigenetic Regulation of rDNA and Cognition. *Neural Plast*. 2016; 2016:8987928.

Zeng L, Yang Y, Hu Y, Sun Y, Du Z, Xie Z, Zhou T, Kong W. Age-Related Decrease in the Mitochondrial Sirtuin Deacetylase Sirt3 Expression Associated with ROS Accumulation in the Auditory Cortex of the Mimetic Aging Rat Model. *PloS one*. 2014;9(2):e88019.

Zhang Y, Zhang Y, Chen M, Zhou Y, Lang M. Galactosylated poly(epsilon-caprolactone) membrane promoted liver-specific functions of HepG2 cells in vitro. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2014;41:52-8.

Zhang S, Dong Z, Peng Z, Lu F. Anti-Aging Effect of Adipose-Derived Stem Cells in a Mouse Model of Skin Aging Induced by D-Galactose. *PloS one*. 2014;9(5):e97573.

Ziv I, Melamed E. Editorial: apoptosis in the aging brain. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2010;15(11):1285-91.

ANEXO

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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: 073-2014-02

Professor responsável: Josiane Budni

Equipe: Vanessa Moraes de Andrade, Jesiel de Medeiros, Gustavo Luis Schiavo, Mauricio Lopes da Silva, Rafaele Bis Dalponte de Sá, Sabrina da Silva, Franciele Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Ricardo Chiengo Sapalo Cassoma, Erico Pigozzi Cassaro, Bruna Luiza Claudiano Voss, Edson Rodrigues Garcia Filho, Guilherme Fretta Ramos, Ludmila de Abreu Castro

Título: "Avaliação de parâmetros comportamentais, bioquímicos e genotóxicos em ratos Wistar envelhecidos e tratados com Butirato de Sódio."

*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 360 Ratos Wistar, com 2, 4 e 16 meses, pesando aproximadamente 350 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: 073-2014-02


Principal Investigator: Josiane Budni

Researchers: Vanessa Moraes de Andrade, Jesiel de Medeiros, Gustavo Luis Schiavo, Mauricio Lopes da Silva, Rafaele Bis Dalponte de Sá, Sabrina da Silva, Franciele Gonçalves Mina, Michelle Lima Garcez, Ricardo Chiengo Sapalo Cassoma, Erico Pigozzi Cassaro, Bruna Luiza Claudiano Voss, Edson Rodrigues Garcia Filho, Guilherme Fretta Ramos, Ludmila de Abreu Castro

Project title: "Evaluation of behavior, biochemistry and genotoxic parameters in aged Wistar rats treated with Sodium Butyrate."

*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, 16 de dezembro de 2014.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
Coordenador da CEUA