

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

**TATIANI BELLETTINI DOS SANTOS**

**EFEITO DA ADMINSTRAÇÃO DA VITAMINA D3 (1 $\alpha$ - 25**  
**DIHIDROXIVITAMINA D3) SOBRE PARÂMETROS**  
**NEUROQUÍMICO E COMPORTAMENTAL EM RATOS *WISTAR***  
**EM PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

**CRICIÚMA**

**2018**

**TATIANI BELLETTINI DOS SANTOS**

**EFEITO DA ADMINSTRAÇÃO DA VITAMINA D3 (1 $\alpha$ - 25  
DIHIDROXIVITAMINA D3) SOBRE PARÂMETROS  
NEUROQUÍMICO E COMPORTAMENTAL EM RATOS *WISTAR*  
EM PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

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

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

Coorientadores: Prof. Dr. Alexandre Gonçalves Dal-Bó

Prof. Dr. Tiago Elias Allievi Frizon

**CRICIÚMA**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S237e Santos, Tatiani Bellettini dos.

Efeito da administração da vitamina D3 (1 $\alpha$ -25 dihidroxivitamina D3) sobre parâmetros neuroquímico e comportamental em ratos *wistar* em processo de envelhecimento / Tatiani Bellettini dos Santos. – 2018.

85 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2018.

Orientação: Josiane Budni.

Coorientação: Alexandre Gonçalves Dal-Bó, Tiago Elias Allievi Frizon.

1. Vitamina D3 – Uso terapêutico. 2. Envelhecimento. 3. Memória espacial - Tratamento. 4. Memória de habitação - Tratamento. 5. Inflamação. I. Título.

CDD 23. ed. 615.328

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



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

---

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Tatiani Bellettini dos Santos** sob o título “**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA VITAMINA D3 (1 $\alpha$ -25 DIHIDROXIVITAMINA D3) SOBRE PARÂMETROS NEUROQUÍMICO E COMPORTAMENTAL EM RATOS WISTAR EM PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

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

Criciúma, SC, 20 de julho de 2018.

**Prof. Dr. EMÍLIO LUIZ STRECK**  
Membro Relator – UNESC

**Prof.ª Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**  
Membro Interno – UNESC

**Prof.ª Dra. MANUELLA PINTO KASTER**  
Membro Externo – UFSC

**Prof.ª Dra. PATRÍCIA DE SOUZA BROCARDO**  
Membro Externo – UFSC

**Prof.ª Dra. Josiane Budni**  
Orientadora

**Prof.ª Dra. Josiane Budni**  
Coordenadora Adjunta do PPGCS

## FOLHA INFORMATIVA

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

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe, Maria de Fátima Bellettine e, ao meu pai do coração, Pedro Paulo Umbelina, por serem meu alicerce e porto seguro, à minha filha Lara Pacheco, por ter feito de mulher que sou hoje, por sempre me olhar com olhos amorosos e me ver como sua heroína, quando na verdade, é ela quem me salva todos os dias.

## AGRADECIMENTOS

Enfim, a fase dos agradecimentos chegou. Eu, como filha de fé que sou, vou iniciar agradecendo ao nosso pai Oxalá por todas as conquistas que me foram permitidas, mas sou ainda mais grata por todas as pedras que encontrei pelo caminho durante essa caminhada, pois contribuíram para o meu fortalecimento e crescimento como ser humano inacabado que sou. Gratidão é a palavra que define todo o meu sentimento.

Agradeço à minha mãe, Maria de Fátima, por ter me dado a vida, por ter aceitado a missão de me trazer ao mundo, me dar educação, amor e, acima de tudo, por ensinar que os bons sentimentos, como a gratidão e o amor ao próximo, são a base que solidifica e nutre nossa essência.

Agradeço ao meu pai de coração, Pedro Paulo, por se manter firme ao lado de minha mãe na luta diária de garantir o sustento da família, não permitindo que houvesse a escassez do amor e da solidariedade entre nós.

Agradeço aos meus irmãos, Maicon e Pedro, por todo o amor, respeito e admiração que demonstram por mim diariamente, eu amo vocês imensamente e, se pudesse escolher, eu nasceria mais mil vezes como irmã de vocês.

Agradeço à minha filha, Lara, o meu eterno bebê, por ter me dado a oportunidade de ser mãe. Ter você foi um grande desafio, talvez o maior que eu já tenha enfrentado, porém, certamente, foi, é, e sempre será a melhor decisão, o melhor presente e a maior satisfação que me fora concedida neste plano. Filha és meu elixir, és a fonte inesgotável da minha força e determinação em busca de sempre melhorar. No teu sorriso eu me fortaleço e no reflexo dos teus olhos eu vejo o melhor do mundo sempre. Te amo!

Agradeço à minha amada avó, Catarina, por não esquecer de mim em suas orações diárias, por sempre me mostrar que tudo tem um lado bom. Vó você é meu grande exemplo de caráter, bondade, amor, doação e preocupação com o próximo.

Agradeço a Dilecia Pereira, minha segunda mãe, por todo o amor, carinho e preocupação, torcida e auxílio.

Agradeço ao meu noivo, Cristiano, por ter se mantido forte ao meu lado, por não ter desistido de mim nem nos meus piores momentos, inclusive durante as minhas TPMs. Obrigada por ser meu parceiro, por estares sempre pronto para me ajudar e me

acalmar diante das adversidades que a vida insiste em colocar em meu caminho. Obrigada por ser a calma quando eu sou a tempestade. Eu amo você.

Agradeço à minha orientadora, amiga e conselheira, Josi, por todo o amor, carinho, dedicação, paciência e parceria. Josi, sua linda, você é um grande exemplo para mim, é aquela pessoa que eu sempre digo que eu quero ser quando crescer. Seus olhões azuis me inspiram e trazem aquele sentimento de esperança e, ao mesmo tempo, aquela certeza de que tudo vai dar certo e que nem o céu é o limite. Muito obrigada por acreditar em mim, por confiar no meu trabalho e me incentivar a melhorar a cada dia. Eu desejo imensamente que a nossa parceria perdure por muitos e muitos anos.

Agradeço às minhas amigas, minhas parceiras de vida e de laboratório, Michelle Garcez (Mi) e Francielle Mina (Franzoca), juntas sempre fomos mais fortes. Vocês me ensinaram e continuam a me ensinar muito, tanto na área científica quanto pessoal. Sem dúvida, vocês duas são um presente que me foi concedido por Deus. Sou grata por tê-las sempre comigo e, apesar da distância que nos separa, Franzoca, e que irá nos separar, Mi, nossos corações e nossos WhatsApps, estão sempre conectados. Eu amo vocês.

Agradeço aos alunos e alunas de iniciação científica, Natália Magnus, Eduarda, Hemilly, Nathália, Gabriel, Alexia, Júlia Budny, Matheus, Maylton, Lucas, Malu, Gustavo Schiavo, Aline, Ariandne e tantos outros que passaram pelo laboratório e nos ajudaram a concluir este trabalho. Vocês são essenciais. Muito obrigada por tudo.

Agradeço aos meus colegas mestrados e doutorandos do Psiquiatria Translacional e do NeuroExp, que também me apoiaram e me incentivaram.

Por fim, agradeço ao meu saudoso amigo e orientador no mestrado, Prof. Dr. Paulo Rômulo de Oliveira Frota, por ter me guiado na iniciação científica, ter acreditado em meu potencial, me levado a realizar meu mestrado e, junto comigo, planejado todo o meu caminho para galgar a carreira acadêmica. Tenho certeza que de onde ele estiver estará sempre olhando e torcendo por mim. Juntamente, gostaria de agradecer a Profa. Dra. Janine Moreira, por ter aceitado o desafio de continuar minha orientação no mestrado em meio a ausência abrupta do prof. Frota.

“A EXPERIÊNCIA NÃO É O QUE ACONTECE COM O HOMEM, É O QUE O  
HOMEM FAZ COM O QUE ACONTECE COM ELE”.

THOMÁS HIGG

## RESUMO

No envelhecimento ocorrem alterações no fluxo sanguíneo cerebral, onde o número de células nervosas é notavelmente reduzido. Neste processo ocorre remodelação contínua e um baixo grau de inflamação crônica, conhecido como *inflammaging*. A vitamina D3 é um hormônio esteróide que tem papéis importantes no sistema nervoso central e está envolvida na regulação da excitotoxicidade neuronal. Há estudos indicando que os baixos níveis de vitamina D3 durante a vida adulta, podem estar ligados ao dano cognitivo e às doenças neurodegenerativas. Assim, este estudo teve como objetivo, avaliar o efeito neuroquímico e comportamental da vitamina D (1, 25 (OH) 2 D3) em ratos Wistar machos com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade. Os animais foram suplementados com vitamina D3, nas doses de 42 e 420 UI/kg ou água via oral por gavagem, por 21 dias. Ao final do tratamento foram avaliadas a memória de habituação ao campo aberto e a memória espacial analisada pelo labirinto em Y e labirinto octogonal. Logo após os testes comportamentais, 22º dia, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do sangue e estruturas cerebrais. No sangue, foram avaliados os níveis de 25(OH) D3 por HPLC. As estruturas do córtex frontal e hipocampo foram utilizadas para as análises dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e IL-10, fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e fator de crescimento do nervo (NGF). Os resultados do presente estudo mostram que a vitamina D no soro apresentou-se aumentada nos animais suplementados principalmente com a dose de 420 UI/kg, em 2, 6, 13 e 22 meses, mas não em 31 meses. De forma geral, as idades de 13 e 22 meses apresentaram dano nas memórias espacial e de habituação, e a vitamina D3 foi capaz de reverter este efeito, por modulação, em animais com 13 meses, dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, e em animais com 22 meses, pela modulação das citocinas IL-6, IL-10 e de NGF. Em animais com 31 meses, o dano do envelhecimento foi revertido somente na dose de 420 UI/kg na memória espacial e, este efeito, pode ter ocorrido por modulação das citocinas como a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e os fatores neurotróficos como o BDNF e NGF. Os resultados do presente estudo corroboram a hipótese de que a vitamina D3 pode exercer uma ação imunomoduladora sobre o envelhecimento. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar o efeito da vitamina D3 sobre a imunosenescência e regulação dos fatores neurotróficos..

**Palavras-chave:** Vitamina D, envelhecimento, memória, inflamação, fatores neurotróficos.

## ABSTRACT

Aging is characterized by changes in cerebral blood flow, and the number of nerve cells is markedly reduced. In this process there are continuous remodeling and a low degree of chronic inflammation termed as *inflammaging*. Vitamin D is a steroid hormone that has important roles in the nervous system. It is involved in the regulation of neuronal excitotoxicity. There are studies indicating that low levels of vitamin D3 during adult life may be linked to cognitive damage and neurodegenerative diseases. The aim of this study was to evaluate the neurochemical and behavioral effects of vitamin D ( $1\alpha$ -25 Dihydroxyvitamin D3) in 2-, 6-, 13-, 22- and 31-month-old male Wistar rat. The animals were supplemented with vitamin D3 at doses of 42 and 420 IU/kg or water by gavage for 21 days. In the end of treatment we evaluate the habituation memory to the open field test, and spatial memory evaluated on the Y Maze and the Radial Maze task. Immediately after the behavioral tests the animals, on the 22<sup>nd</sup> day, the animals were subjected to euthanasia to collect the blood and brain structures. In the blood, it was evaluated the 25 (OH) D3 levels by HPLC. The frontal cortex and hippocampus were used to analyze of tumoral necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nervous growth factor (NGF) levels. The results of present study have shown an increase of serum vitamin D, mainly the 420 UI/kg, 2-, 6- 13- and 22-month-old animals, but not in 31-month-old animals. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10, and vitamin D3 levels at 13 and 22 months of age. In general, in 13- and 22-month-old animals, showed memory impairment. The vitamin D3 was able to reverse this effect by the modulation of the cytokines IL-6, IL-10 and NGF. In 31-month-old animals, the damage of aging was reversed just at the dose of 420 IU/kg in spatial memory. This effect may have occurred by modulating of cytokines like IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and neurotrophic factors like BDNF and NGF. The results of the present study corroborate the hypothesis that vitamin D3 may exert an immunomodulatory action on aging. However, further studies are needed to elucidate the effect of vitamin D3 on immunosenescence and regulation of neurotrophic factors.

**Keywords:** Vitamin D, aging, memory, inflammation, neurotrophic factors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Pirâmide da estrutura etária no Brasil.....	16
<b>Figura 2:</b> Processo de envelhecimento celular.....	18
<b>Figura 3:</b> Metabolismo da vitamina D.....	25
<b>Figura 4:</b> Desenho experimental. Etapas: 1, 2, 3 e 4.....	33
<b>Figura 5:</b> Desenho experimental. Etapa: 5.....	33
<b>Figura 6:</b> Avaliação dos níveis de vitamina D3 no soro de animais com 2, 6 e 13 meses suplementados com vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) por 21 dias através do HPLC.....	38
<b>Figura 7:</b> Efeito da suplementação com vitamina D3 nas doses de 42UI/kg e 420UI/kg no teste de labirinto em Y em ratos Wistars machos em processo de envelhecimento nas idades de 2, 6, 13 e 22 meses.....	39
<b>Figura 8 A e B:</b> Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) por 21 dias em animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses no teste de habituação ao campo aberto.....	41
<b>Figura 9 A e B:</b> Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) por 21 dias em animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses na memória espacial avaliada no teste do labirinto octogonal.....	43
<b>Figura 10 A e B:</b> Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420UI/kg) durante 21 dias nos níveis de TNF- $\alpha$ em estruturas cerebrais do córtex frontal e hipocampo de ratos Wistars.....	45
<b>Figura 11 A e B:</b> Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420UI/kg) durante 21 dias nos níveis de IL- 1 $\beta$ em estruturas cerebrais do córtex frontal e hipocampo de ratos Wistars.....	47
<b>Figura 12 A e B:</b> Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420UI/kg) durante 21 dias nos níveis de IL-6 em estruturas cerebrais do córtex frontal e hipocampo de ratos Wistars.....	49
<b>Figura 13 A e B:</b> Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420UI/kg) durante 21 dias nos níveis de IL- 10 em estruturas cerebrais do córtex frontal e hipocampo de ratos Wistars.....	50
<b>Figura 14 A e B:</b> Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420UI/kg) durante 21 dias nos níveis de BDNF em estruturas cerebrais do córtex frontal e hipocampo de ratos Wistars.....	51
<b>Figura 15 A e B:</b> Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420UI/kg) durante 21 dias nos níveis de NGF em estruturas cerebrais do córtex frontal e hipocampo de ratos Wistars.....	53
<b>Tabela 1:</b> Apresenta de forma resumida os resultados dos testes comportamentais e análises bioquímicas.....	54

## Abreviaturas

1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> - forma ativa da vitamina D

25OHase - 25-hidroxilase

ANOVA - Análise de variância (do inglês: *analysis of variance*)

BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês: *Brain-derived neurotrophic factor*)

BDNF<sup>+/</sup> - deleção heterozigótica do gene do BDNF

BHE - barreira hematoencefálica

CAT – catalase

CF – córtex frontal

CMSP - células mononucleares do sangue periférico

CYP27B1 - citocromo P450, isoforma 27B1

CYP2R - citocromo P450, isoforma 2R

DA - Doença de Alzheimer

ELISA - Imunoensaio enzimático (do inglês: *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*)

EM - esclerose múltipla

EOC13 - linhagem celular microglial 13

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERO - espécies reativas de oxigênio

GDNF - fator neurotrófico derivado de células gliais (do inglês: *Glial cell-derived neurotrophic factor*)

GPx - glutationa peroxidase

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *high performance liquid chromatography*)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística

IGF-1 - fator 1 de crescimento tipo insulina (do inglês: *insulin-like growth factor 1*)

IL-10 - interleucina 10

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

IL-6 - interleucina 6

IP – via intraperitoneal

LTP - potencial de longa duração

MCP-1/CCL2 - proteína quimiotática de monócitos-1

NGF - fator de crescimento derivado do nervo (do inglês: *Nerve growth factor*)

NO - óxido nítrico, do inglês: *nitric oxide*

ONU - Organização das Nações Unidas

PAV - pneumonia associada à ventilação

P75NTR – receptor de neurotrofina P75 (do inglês: *p75 neurotrophin receptor*)

PKC - proteína cinase C (do inglês, *protein kinase C*)

pró-NGF- fator de crescimento derivado do nervo na forma pró (do inglês: *Nerve growth factor*)

pró-BDNF- fator neurotrófico derivado do cérebro na forma pró (do inglês: *Brain-derived neurotrophic factor*)

RXR - receptor X do receptor nuclear para o ácido retinóico

SAMP8 - camundongo propenso a senescência acelerada 8

SNC- sistema nervoso central

SOD - superóxido dismutase

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral- $\alpha$  (do inglês: *Tumor necrosis factor alpha*)

TrkB - receptores tirosina cinase B (do inglês: *tyrosine receptor kinase B*)

UI/kg - Unidades internacionais por quilo de peso

VDR - receptor de vitamina D (do inglês: *vitamin D receptor*)

V.O – via oral

VDR/RXR – complexo receptor de vitamina D + receptor X do ácido retinóico

$\alpha$ -NGF - fator de crescimento derivado do nervo alfa (do inglês: *Nerve growth factor- $\alpha$* )

$\beta$ -NGF - fator de crescimento derivado do nervo beta do inglês: *Nerve growth factor- $\beta$* )

$\gamma$ -NGF - fator de crescimento derivado do nervo gama do inglês: *Nerve growth factor- $\gamma$* )

## **Sumário**

1. Introdução.....	16
1.1. Envelhecimento.....	16
1.2. Inflamação e envelhecimento .....	18
1.3. Fatores neurotróficos e envelhecimento.....	22
1.4. Vitamina D3 e o envelhecimento.....	25
1.5 Justificativa.....	31
2. Objetivos gerais .....	32
2.1 Objetivos específicos .....	32
3. Materiais e Métodos.....	33
3.1.Desenho experimental.....	33
3.2. Tratamento crônico .....	33
3.3 Testes comportamentais .....	35
3.3.1 Labirinto em Y.....	35
3.3.2 Teste de habituação ao campo aberto.....	36
3.3.3 Labirinto octogonal .....	37
3.3.4. Eutanásia.....	37
3.4 Análises Bioquímicas.....	38
3.4.1 Análise dos níveis de vitamina D3 no soro.....	38
3.4.2 Análise dos níveis de citocinas e fatores neurotróficos.....	38
3.5. Análise estatística.....	39
4 Resultados .....	40
5 Discussão.....	57
CONCLUSÃO.....	72
Referências.....	73
Anexo1: Certificado de Aprovação na Comissão de Ético no Uso de Animais .....	86

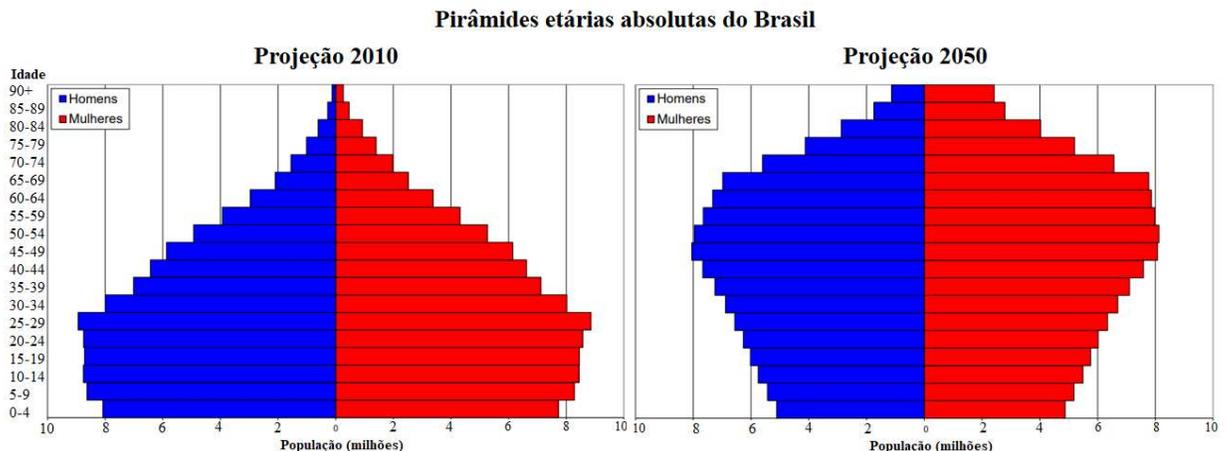
## **1. Introdução**

### **1.1. Envelhecimento**

O envelhecimento é compreendido como uma etapa natural da vida, tendo como característica principal a acentuada perda da capacidade de adaptação e a menor expectativa de sobrevivência. Trata-se de um processo biológico complexo, dinâmico, caracterizado por contínuas remodelações (Minciullo, Catalano et al. 2016). Esta condição, torna o indivíduo mais vulnerável e predisposto a morbidades e mortalidade (Borba Lde, Guimaraes et al. 2012). Neste sentido, o envelhecimento é uma fase do desenvolvimento humano em que ocorre um processo de transformação do organismo, caracterizada por mudanças psicológicas, sociais e físicas (Zhang, Zhang et al. 2014). Apesar dos esforços dos pesquisadores, a progressão e os mecanismos de envelhecimento não são ainda claramente compreendidos. 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 (Hayflick 2000, Cesari, Vellas et al. 2013).

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 a população idosa passará de 901 milhões 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. 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 (ONU, 2013; ONU, 2015). No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e estatística – IBGE (2013), 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 20% da população com idade igual ou superior a 60 anos (figura 1) (IBGE, 2013; 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 2010 e 2050. Adaptado de IBGE, 2013. Disponível em: < <https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000014425608112013563329137649.pdf> >

Durante o envelhecimento, o número de células nervosas cerebrais é notavelmente reduzido, bem como as alterações no fluxo sanguíneo cerebral que estão associados ao aumento do risco de déficits cognitivos. Ocorre também perda neuronal em algumas partes específicas do encéfalo, tais como no *locus ceruleus*, substância negra, hipocampo, núcleo caudado, putâmen e córtex cerebral (Cesari, Vellas et al. 2013, Bartsch and Wulff 2015, Zlatar, Bischoff-Grethe et al. 2016). Essas alterações fisiológicas e anatômicas acabam levando à disfunção de memória, principalmente a memória recente (Izquierdo, Barros et al. 1998). Com o envelhecimento ocorre também aumento da incidência de algumas doenças, principalmente das doenças neurodegenerativas, entre elas, a de maior incidência é a Doença de Alzheimer (DA) (Ismail, Nguyen et al. 2011). Os avanços no conhecimento das doenças associadas à idade superaram os avanços na compreensão dos processos de envelhecimento fundamentais que estão localizados a base da vulnerabilidade para estas patologias (Hayflick 2000). Portanto, além do processo de envelhecimento ser uma deterioração progressiva de todos os mecanismos homeostáticos do cérebro, também é acompanhado de declínio cognitivo (Bishop, Lu et al. 2010).

As alterações na cognição que ocorrem com o processo de envelhecimento normal estão relacionadas com a redução 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 (Yu, Oh et al. 2016). 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 (Scherling, Wilkins et al. 2016).

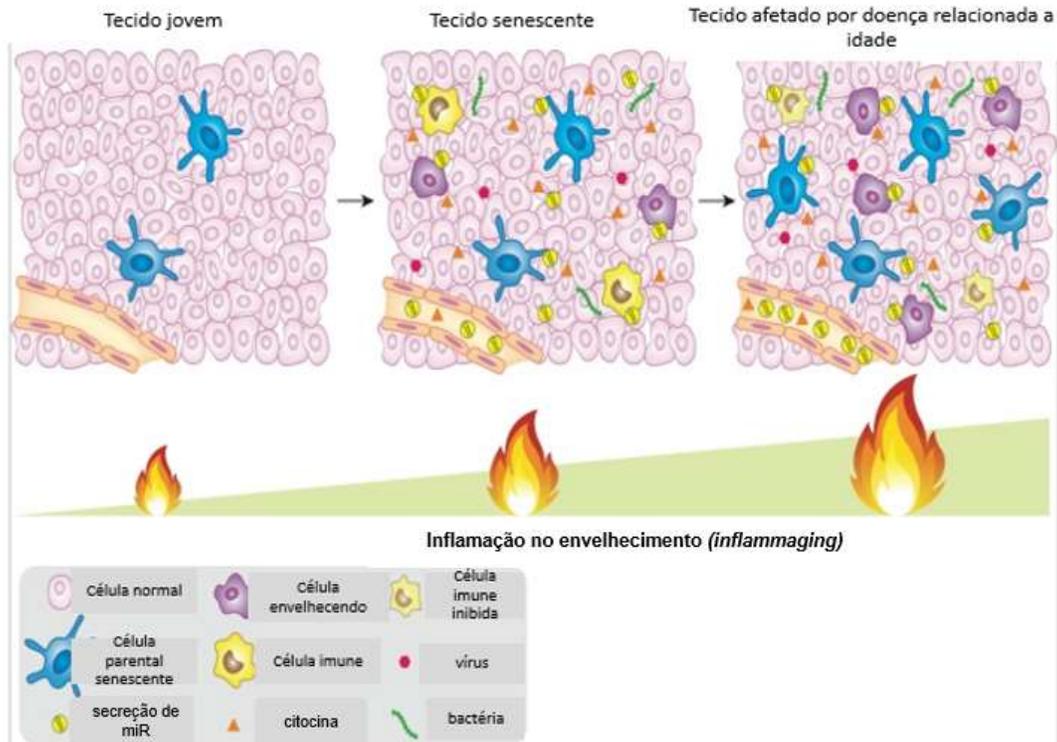
O envelhecimento dispõe de muitas teorias que buscam explicar as alterações fisiológicas decorrentes desse processo. Dentre essas se destacam as teorias estocásticas e genéticas. As estocásticas sugerem que a perda de funcionalidade no envelhecimento é causada pelo acúmulo aleatório de lesões, associados à ação ambiental em moléculas vitais, que provocam um declínio fisiológico progressivo. Estão incluídas neste grupo, a teoria da quebra de ligações (Cristofalo, Gerhard et al. 1994), a teoria da glicosilação avançada (Zimmerman, Meistrell et al. 1995), a teoria do estresse oxidativo (Harman 1956) e a recente teoria da *inflammaging* (Davinelli, Maes et al. 2016). Já, dentre as teorias genéticas, destacam-se: a teoria do envelhecimento celular (Hayflick and Moorhead 1961), teoria da mutagênese intrínseca (Burnet 1974) e a teoria dos telômeros (Kurenova and Mason 1997). Muito embora sejam apresentadas diferentes teorias para elucidar o envelhecimento, ambas acabam seguindo as mesmas direções conclusivas, ou seja, o organismo senescente, com o avanço da idade, apresenta diminuição da funcionalidade orgânica (Samanez-Larkin and Knutson 2015). Este estudo abordou fatores inflamatórios ligados ao envelhecimento, como o *inflammaging* e as alterações da via dos fatores neurotróficos, que também estão associadas ao processo de envelhecimento.

## **1.2. Inflamação e envelhecimento**

O envelhecimento humano é um processo biológico muito complexo e dinâmico que resulta de uma combinação ambiental, genética, epigenética e fatores estocásticos e é caracterizado por remodelação contínua e por um baixo grau de inflamação crônica, um fenômeno denominado como *inflammaging* (Franceschi, Bonafe

et al. 2000, Franceschi and Campisi 2014, Davinelli, Maes et al. 2016, Minciullo, Catalano et al. 2016, Prattichizzo, De Nigris et al. 2016). A teoria do *inflammaging*, é uma das mais recentes sobre o envelhecimento, está concentrada na resposta imune, e leva em consideração a ativação da inflamação crônica subclínica de baixo grau que ocorre com o envelhecimento. Os indivíduos que desfrutam de uma vida longa, especialmente centenária, parecem lidar com a inflamação crônica subclínica por meio de uma resposta anti-inflamatória, chamada, portanto, *anti-inflammaging* (Davinelli, Maes et al. 2016, Minciullo, Catalano et al. 2016, Prattichizzo, De Nigris et al. 2016).

O *inflammaging* é um fator de risco muito significativo para a morbidade e para a mortalidade na população idosa, assim como para a maioria das doenças relacionadas com a idade que compartilham uma patogênese inflamatória. Este fenômeno é provocado por uma carga antigênica contínua e estresse (Franceschi, Bonafe et al. 2000, Franceschi and Campisi 2014). Estudos recentes sugerem que uma comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imunológico é crucial para manter a homeostase do sistema nervoso central (SNC). Um dos mais reconhecidos efeitos do envelhecimento cerebral é a desregulação do sistema imunológico como resultado da produção não controlada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de citocinas pró-inflamatórias (figura 2) (Esiri 2007, Davinelli, Maes et al. 2016).



**Figura 2.** Processo de envelhecimento celular. A figura demonstra o processo de *inflammaging* no envelhecimento dos tecidos (tecido jovem as células apresentam características normais, com poucos sinais de células senescentes). O tecido senescente demonstra a presença de células senescentes, ação de vírus e bactérias o que acarreta a ativação de células de defesa, liberação de citocinas e secreção de miR (micro RNA envolvido no dano ao DNA) no tecido afetado por uma doença ligada ao envelhecimento. Desta forma, ocorre a inibição de células de defesa, bem como o aumento dos parâmetros inflamatórios quando comparados ao tecido senescente. Adaptado de (Olivieri, Albertini et al. 2015).

Ao longo das próximas décadas, tendo em conta a expectativa de vida crescente da população idosa, a incidência do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade deverá aumentar drasticamente. Um fator importante que desempenha um papel crucial no envelhecimento cerebral é a demanda alta de energia dos neurônios para preservar os processos neuronais e manter a capacidade cognitiva. O elevado consumo de oxigênio para a obtenção de energia pode refletir na maior vulnerabilidade do cérebro ao ataque de espécies reativas e à inflamação subsequente (Esiri 2007, Davinelli, Maes et al. 2016), uma vez que ocorre desregulação do sistema imunológico, como resultado da produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias (Hsieh and Yang 2013, Fischer and Maier 2015). Esta condição crônica tem sido definida como *oxi-inflammaging* e pode contribuir para a perda neuronal em diferentes doenças neurodegenerativas, resultando em um acelerado processo neurodegenerativo (Franceschi, Capri et al. 2007, Rosano, Marsland et al. 2012).

No cérebro, as respostas imunológicas são minuciosamente controladas. Esta regulação, em parte, depende da barreira hematoencefálica (BHE) e, também, através da modulação da resposta das células residentes do cérebro, mais especificamente a micróglia e os astrócitos e, em menores proporções, os neurônios. A micróglia é a principal célula imunológica residente do cérebro. Ela tem por atribuição conferir imunidade inata, porém, os astrócitos e oligodendrócitos, também se encontram envolvidos na resposta inflamatória neural (Tansey, McCoy et al. 2007, Taylor, Main et al. 2013). A micróglia residente no cérebro saudável exibe um fenótipo de repouso, entretanto, sofre ativação quando submetida a tensões, como a invasão do patógeno, lesões ou o acúmulo de proteínas tóxicas, iniciando respostas imunes para estimular o reparo dos tecidos, fazendo a detoxificação de detritos e células apoptóticas. Sua atuação promove a homeostase cerebral através da produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator 1 de crescimento tipo insulina (IGF-1) e citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10). A IL-10 é uma importante citocina imunorreguladora e é produzida por quase todos os tipos de células dentro do sistema inato, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas (DCs), mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células natural *killer* e adaptativa (incluindo células T CD4 (+), CD8 (+) e células B) (Gabrysova, Howes et al. 2014).

A persistência dos estímulos inflamatórios pode acarretar na superprodução de fatores neurotóxicos incluindo citocinas, quimiocinas e prostaglandinas. É amplamente considerado que a neuroinflamação aguda é benéfica no SNC após lesão ou infecção, garantindo a homeostase para proteção do organismo. Porém, a neuroinflamação crônica é prejudicial ao SNC e isso pode ser atribuído, pelo menos em parte, à geração de EROs (Godbout, Chen et al. 2005, Taylor, Main et al. 2013). As citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), irão agir nos astrócitos, induzindo a resposta imune adaptativa, enquanto que as quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1/CCL2), atuam no recrutamento de células imunitárias adicionais. A resposta inflamatória no cérebro envolve tanto o sistema imune inato como o adaptativo para proporcionar um equilíbrio entre efeitos benéficos e efeitos deletérios (Taylor, Main et al. 2013). Em condições fisiológicas normais, os linfócitos T e B ativados não estão presentes em grande número no SNC. No entanto, após infecção ou lesão no SNC e subsequente indução da resposta imune inata, a produção de citocinas pró-inflamatórias,

tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , pelas células gliais, está aumentada. Isso aumenta a permeabilidade da BHE, levando ao aumento da atividade (super-regulação) das moléculas de adesão celular nas células endoteliais microvasculares. As células T ativadas e células B migram para o local da lesão neuronal. Além disso, há uma regulação positiva em quimiocinas no cérebro, levando ao aumento da migração de leucócitos periféricos (Godbout, Chen et al. 2005, Taylor, Main et al. 2013).

Outra citocina pró-inflamatória que desempenha um papel central na defesa do hospedeiro, auxiliando nas respostas imunes, na hematopoiese e nas reações de fase aguda, é a interleucina 6 (IL-6) (Simpson, Hammacher et al. 1997, Hubackova, Krejcikova et al. 2012). Essa interleucina é regulada por citocinas inflamatórias, neurotransmissores e neuropeptídeos nas células cerebrais e, as vias de sinalização envolvendo o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Fator nuclear kappa B (NF-KB) e a proteína cinase C (PKC), induzem a produção desta citocina nos astrócitos (Simpson, Hammacher et al. 1997, Heidary, Rakhshi et al. 2014). Esta interleucina é um fator de diferenciação das células B, a qual pode induzir a maturação desta célula e de células plasmáticas. A IL-6 possui várias funções fisiológicas e fisiopatológicas no sistema imune e no SNC. Esta citocina desempenha alguns papéis importantes na neurogênese e, além disso, na maturação das células neuronais e gliais em condições normais, sendo um importante marcador para ser avaliado em estado saudável ou patológico (Simpson, Hammacher et al. 1997, Hubackova, Krejcikova et al. 2012, Heidary, Rakhshi et al. 2014).

Contudo, um dano cerebral pode influenciar o processo de envelhecimento induzindo alterações gliais e neuronais, principalmente por induzir neuroinflamação, impactando na saúde mental do indivíduo idoso o que acaba contribuindo para a menor qualidade de vida do mesmo. Redução neste processo neuroinflamatório pode contribuir enormemente na melhora de qualidade de vida destes indivíduos (Ziebell, Rowe et al. 2016).

### **1.3. Fatores neurotróficos e envelhecimento**

Em seres humanos a senescência das células neurais promove uma série de modificações morfológicas que incluem alargamento dos ventrículos, diminuição da

massa encefálica e a perda, histopatologicamente significativa, do número de sinapses. Neste sentido, os fatores neurotróficos apresentam ligação direta com o comprometimento cognitivo em cérebros envelhecidos (Burke and Barnes 2006).

O desenvolvimento fenotípico e manutenção de populações de células específicas em desenvolvimento no SNC dependem dos fatores neurotróficos que são peptídeos secretados com a função de crescimento e desenvolvimento (Siegel and Chauhan 2000). Estes fatores neurotróficos apresentam-se divididos em quatro famílias: superfamília do fator de crescimento derivado do nervo (NGF); família do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF); super família da neuroquina ou neuropoietina e a superfamília do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Siegel and Chauhan 2000) (Allen, Watson et al. 2013). Os principais fatores neurotróficos abordados neste estudo incluem o NGF e o BDNF.

A maioria dos indivíduos idosos mostra uma diminuição gradual das capacidades cognitivas que estão associadas às alterações corticais ou do hipocampo, regiões do cérebro envolvidas em processos de memória e aprendizagem. Logo, esses efeitos cognitivos resultam da plasticidade neuronal prejudicada, que é alterada no envelhecimento normal. As neurotrofinas e seus receptores, notadamente o BDNF, são expressos em áreas cerebrais que exibem um alto grau de plasticidade (isto é, o hipocampo e o córtex cerebral) e são considerados como genuínos mediadores moleculares da plasticidade sináptica funcional e morfológica (Tapia-Arancibia, Aliaga et al. 2008, Budni, Bellettini-Santos et al. 2015). O BDNF é uma neurotrofina que ajuda a proteger os neurônios de danos causados por infecções ou lesões. Ele é uma pequena proteína dimérica, estruturalmente relacionado com o NGF, que existe em abundância e é amplamente expresso no cérebro de mamíferos adultos (Murer, Yan et al. 2001, Patterson 2015). O BDNF é um mediador importante da plasticidade sináptica e da formação da memória (Cowansage, LeDoux et al. 2010).

A expressão do BDNF no SNC é modificada por vários tipos de lesões cerebrais como, por exemplo, a atividade convulsiva, estresse, isquemia e hipoglicemia. As alterações em sua expressão podem contribuir para algumas patologias, tais como, a depressão, a DA, a doença de Parkinson e a epilepsia (Tapia-Arancibia, Rage et al. 2004). O BDNF é considerado a principal neurotrofina do cérebro, sendo produzido, principalmente, pela glia e pelos núcleos neuronais, é bastante expresso no hipocampo,

neocórtex, amígdala e cerebelo (Shimizu, Hashimoto et al. 2003). Entretanto, sua expressão pode ser afetada pelo glutamato e a despolarização de membrana através de canais de cálcio ( $Ca^{+2}$ ) (Rage, Silhol et al. 2007). Suas ações sobre os neurônios sensoriais, glânglio da retina, neurônios colinérgicos, neurônios motores espinhais e neurônios dopaminérgicos, envolvem a proliferação, manutenção, diferenciação e sobrevivência destes neurônios (Pruunsild, Kazantseva et al. 2007). O efeito do BDNF é mediado através dos receptores tirosina cinase B (TrkB) (Chao, Xie et al. 2016) e também facilita a síntese e consolidação de novas memórias, pelo fortalecimento das conexões sinápticas envolvendo o potencial de longa duração (LTP) (Korte, Carroll et al. 1995). O receptor de neurotrofina p75 (P75NTR) é outro receptor para BDNF, este é importante para o refinamento e correta inervação durante o desenvolvimento, porém, pode mediar ações como apoptose e está associado ao processo inflamatório (Chao, Rajagopal et al. 2006). O ligante do P75NTR geralmente é o pró-BDNF, ou seja, a forma imatura do BDNF. Esta ligação acontece antes mesmo que o BDNF seja clivado para se tornar ativo ou maduro (Teng and Hempstead 2004, Budni, Bellettini-Santos et al. 2015).

No envelhecimento, o polimorfismo genético do BDNF pode afetar a memória episódica em idosos (Kennedy, Reese et al. 2015). Além disso, foi observado que o BDNF pode ser um marcador da função cognitiva em mulheres idosas (Komulainen, Pedersen et al. 2008). Outro estudo mostrou que os receptores para BDNF, mais do que o próprio BDNF, podem ser os desencadeadores de alterações neuroendócrinas associadas com o envelhecimento (Rage, Silhol et al. 2007). Também um estudo pré-clínico mostrou que a redução de BDNF induz dano na memória em envelhecidos (Petzold, Psotta et al. 2015). As doenças neurodegenerativas estão se tornando um problema cada vez maior no envelhecimento da população. Os baixos níveis de BDNF estão associados com a patogênese de numerosas doenças neurodegenerativas (You, Park et al. 2016). Este fator neurotrófico promove a sobrevivência e diferenciação de neurônios, protegendo-os contra a neurodegeneração, danos neuronais e inibe o declínio da memória e cognição relacionados à idade (Li, Xu et al. 2016).

A segunda neurotrofina abordada neste estudo é o NGF. Este é uma glicoproteína composta por três subunidades:  $\alpha$ -NGF que é inativa;  $\beta$ -NGF que é biologicamente ativo e  $\gamma$ -NGF que processa o precursor de NGF para a sua forma madura. O NGF é sintetizado como um precursor do pró-NGF e é segregado fora das células ou

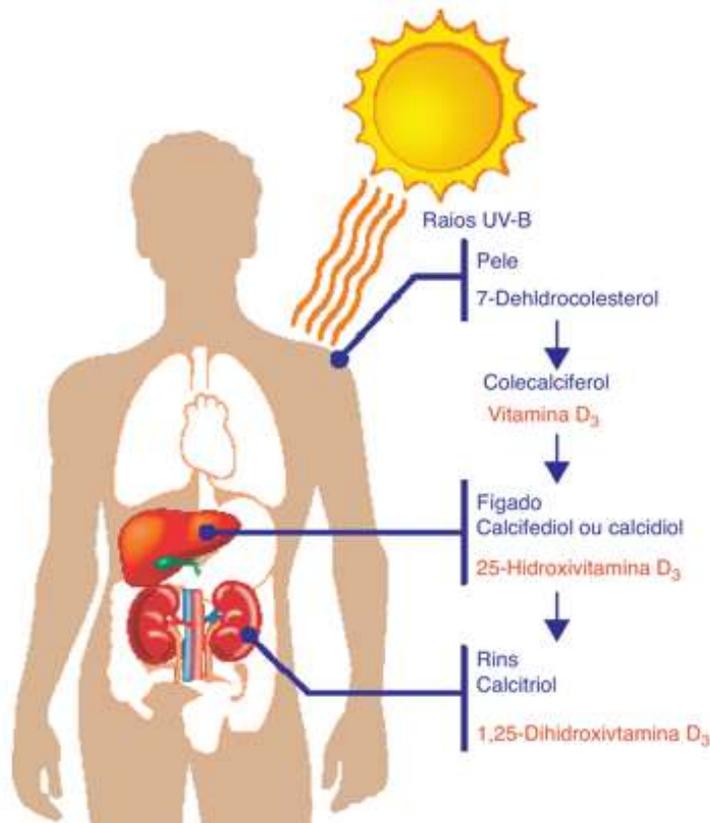
clivado intracelularmente em NGF maduro. A secreção de NGF pode ser uma mistura de pró-NGF e o NGF maduro (Budni, Bellettini-Santos et al. 2015, Triaca, Sposato et al. 2016). O pró-NGF, a forma precursora não clivada do NGF, liga-se ao receptor p75NTR com maior afinidade (Lee, Kermani et al. 2001). Notavelmente, o receptor p75NTR é bem conhecido por seu papel na mediação da morte celular neuronal (Underwood and Coulson 2008). Existem evidências crescentes de que o pró-NGF forma um complexo heterotrimérico com o receptor p75NTR e o receptor de neurotensina e sortilina, para ativar cascatas apoptóticas (Nykjaer, Lee et al. 2004, Al-Shawi, Hafner et al. 2008).

O NGF é importante para a realização da plasticidade neuronal e sobrevivência dos neurônios colinérgicos das regiões do córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo e prosencéfalo basal, que estão relacionadas com a memória. Apresenta-se diminuído à medida que o organismo atinge o envelhecimento. Este fator neurotrófico pode contribuir para um declínio dependente da função cognitiva com o avanço da idade. Portanto, o NGF desempenha um papel significativo no desenvolvimento da memória e cognição, na sobrevivência e na manutenção dos neurônios colinérgicos durante o processo de envelhecimento cerebral (Budni, Bellettini-Santos et al. 2015, Campos, Rocha et al. 2016, Triaca, Sposato et al. 2016).

#### **1.4. Vitamina D3 e o envelhecimento**

A vitamina D é um hormônio esteróide que apresenta um papel importante na regulação dos níveis de  $Ca^{2+}$ , de fósforo e de mineralização óssea do corpo (Briones and Darwish 2012) e, também, é bem reconhecida como um neuroesteróide que modula múltiplas funções cerebrais (Eyles, Feron et al. 2009). Um crescente número de evidências indica que a vitamina D desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do cérebro na neurotransmissão, na neuroproteção e na imunomodulação (Kalueff and Tuohimaa 2007, Buell and Dawson-Hughes 2008, Briones and Darwish 2012, Mpandzou, Ait Ben Haddou et al. 2016). No entanto, os mecanismos moleculares precisos pelos quais a vitamina D exerce essas funções no cérebro ainda não estão bem elucidados (Cui, Gooch et al. 2017).

A vitamina D pode ser obtida através de fontes de alimentos inclusos na dieta, ou sintetizada na pele a partir de 7-deidrocolesterol durante a exposição à luz solar (raios ultravioletas do tipo B) (Kalueff and Tuohimaa 2007, Buell and Dawson-Hughes 2008, Briones and Darwish 2012). Após a ingestão, o hormônio é biologicamente inerte e precisa ser ativado através de uma via enzimática. Esta, por sua vez, será constituída por duas etapas envolvendo 25-hidroxilase e  $1\alpha$ -hidroxilase para a conversão da vitamina D em sua forma ativa ( $1,25$  (OH) $_2$  D $_3$ ). A produção cutânea da vitamina D é influenciada por alguns fatores, tais como, a hora do dia, a estação, a latitude, a pigmentação da pele, o uso de filtro solar e o envelhecimento. A vitamina D (representada por D $_2$  ou D $_3$ ), a partir da síntese cutânea ou ingestão dietética/suplementar, liga-se à proteína de ligação à vitamina D (PAD) e é transportada para o fígado. Neste órgão, ela sofre hidroxilação no carbono-25 pela enzima do citocromo P450 (CYP2R), dando origem a 25-hidroxivitamina D (25 (OH) D) que é o principal metabólito circulante de vitamina D. A partir do fígado este metabólito é transportado para os rins, onde sofre uma segunda hidroxilação na posição carbono-1 pelo citocromo P450 (5 (OH) D- $1\alpha$ -hidroxilase ou (CYP27B1)). Todo esse processo irá resultar na produção de 1,25-di-hidroxivitamina D ( $1,25$  (OH) $_2$  D $_3$ ), que se trata do metabólito biologicamente ativo da vitamina D (figura 2) (Buell and Dawson-Hughes 2008, Briones and Darwish 2012, Schlogl and Holick 2014, Mpandzou, Ait Ben Haddou et al. 2016, Thacher and Levine 2016) (Figura 3).



**Figura 3.** Metabolismo da vitamina D. A figura demonstra o metabolismo e a nomenclatura da vitamina D. A incidência de raios solares ultravioleta tipo-B (UVB) na pele, ativam a síntese da vitamina D<sub>3</sub> a partir da 7-deidrocolesterol. Após sua síntese é transportada para o fígado onde será hidroxilada pela enzima citocromo P450 (CYP2R) em 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>. Possui como transportador a PAD (proteína de ligação à vitamina D). Nos rins sofre uma segunda hidroxilação através da enzima citocromo P450 1 $\alpha$  hidroxilase (CYP27B1), resultando no metabólico ativo da vitamina D<sub>3</sub> (1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub>). Adaptado de (Lichtenstein, Ferreira-Junior et al. 2013).

Uma vez ativada, a vitamina D influencia diferentes sistemas metabólicos através da atuação em vias genômicas e não genômicas. Além de regular a absorção de Ca<sup>2+</sup> intestinal e a homeostase mineral, 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, se liga ao receptor de Vitamina D (VDR), que interage com o receptor X do receptor nuclear para o ácido retinóico (RXR). Na presença de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> o complexo VDR/RXR liga-se à pequenas sequências de DNA conhecidos como elementos de resposta vitamina D (VDREs) e inicia uma cascata de interações moleculares que modulam a transcrição de vários genes em tecidos por todo o organismo (Buell and Dawson-Hughes 2008, Jia, Wang et al. 2015, Pang, Qi et al. 2016). O VDR também está presente no cérebro adulto e em desenvolvimento, onde realiza a mediação dos efeitos da vitamina D no desenvolvimento e na função cerebral (Ramakrishna 1999, Mpandzou, Ait Ben Haddou et al. 2016, Cui, Gooch et al. 2017).

Com base nestas informações, é altamente provável que a vitamina D desempenhe um importante papel no funcionamento neurológico. Estudos em animais indicam que a vitamina D é importante para o desenvolvimento do cérebro (Ramakrishna 1999, Jia, Wang et al. 2015, Al-Harbi, Khan et al. 2017).

O interesse na relação entre a vitamina D e a função do SNC foi ampliado depois do reconhecimento da atividade neural deste esteróide (Buell and Dawson-Hughes 2008). A evidência para um papel da vitamina D na função cerebral começou a ser observado há algumas décadas atrás (Dragneva, Isaeva et al. 1966, Hanafy, Hassanein et al. 1967). Os resultados apontavam a presença de VDR no cérebro dos animais experimentais e demonstraram que a  $1,25\text{ (OH)}_2\text{ D}_3$  estava presente no líquido cefalorraquidiano desses animais (Lichtenstein, Ferreira-Junior et al. 2013). Os estudos em animais revelaram a presença de VDR no neuroepitélio durante o início da neurogênese e em fases posteriores, em uma área envolvida na manutenção de células estaminais neurais, a zona subventricular (Buell and Dawson-Hughes 2008, Lichtenstein, Ferreira-Junior et al. 2013). Dados em animais confirmam a expressão de VDR em regiões específicas do cérebro incluindo o lobo temporal, córtex cingulado, tálamo, cerebelo, amígdala e regiões do hipocampo (Eyles, Smith et al. 2005, Buell and Dawson-Hughes 2008). Um estudo com ratos F344, mostrou que a vitamina D foi capaz de modular o aumento do estado pró-inflamatório relacionado à idade e a carga amiloide. Este efeito foi associado à diminuição do comprometimento da memória, pela vitamina D, observada nos ratos idosos, tornando-a uma opção terapêutica útil para aliviar os efeitos do envelhecimento na função cognitiva (Briones and Darwish 2012).

O nível de vitamina D pode desempenhar um papel imunomodulador no SNC (Casaccia-Bonnet, Pandozy et al. 2008). Estudos clínicos vem demonstrando que há uma associação entre os níveis baixos de vitamina D e distúrbios de memória episódica, que se referem a informações de contexto espacial (Annweiler, Allali et al. 2009, Soni, Kos et al. 2012, Littlejohns, Henley et al. 2014). Também tem sido mostrado que a vitamina D está associada a um melhor desempenho cognitivo, onde existe um risco de comprometimento cognitivo de até quatro vezes maior em indivíduos com deficiência grave de vitamina D ( $<25\text{ nmol/L}$ ) em comparação com indivíduos normais ( $\geq 75\text{ nmol/L}$ ) (Soni, Kos et al. 2012). A deficiência de vitamina D, também está associada ao aumento do risco de demência de todas as causas (incluindo a DA) sendo, adicionalmente,

evidenciado que há uma associação de deficiência de vitamina D com queixa cognitiva subjetiva em pacientes geriátricos (Soni, Kos et al. 2012, Annweiler, Montero-Odasso et al. 2013, Obermann, Morris et al. 2013, Littlejohns, Henley et al. 2014, Tot Babberich Ede, Gourdeau et al. 2015). Outro estudo indicou que maiores níveis séricos de vitamina D são associado com um menor risco de doenças autoimunes como, por exemplo, a esclerose múltipla (EM) (Spach, Pedersen et al. 2004).

O papel potencial da vitamina D e do seu metabólito bioativo  $1, 25 (OH)_2 D_3$  na regulação das respostas imunes é reconhecido através do VDR. O VDR está presente em macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B ativados. A função e a proliferação dessas células podem ser reguladas por  $1, 25 (OH)_2 D_3$ . A capacidade de  $1, 25 (OH)_2 D_3$  para regulação de respostas imunes tem utilidade clínica na prevenção de algumas doenças autoimunes em modelos animais e em humanos (Hayes 2000, Annweiler, Allali et al. 2009, Briones and Darwish 2012, Naghavi Gargari, Behmanesh et al. 2015). O VDR estimula a transcrição de vários genes para alterar a função celular (Hayes 2000). As enzimas ativadoras da vitamina D, a 25-hidroxilase, a  $1\alpha$ -hidroxilase e a enzima inativadora 24-hidroxilase, também estão presentes no cérebro (Miller and Portale 2000, Garcion, Wion-Barbot et al. 2002). Portanto, a capacidade do cérebro para sintetizar localmente a forma ativa da vitamina D,  $1,25(OH)_2 D_3$  bem como, a presença de VDR, sugerem que a vitamina D está envolvida no desenvolvimento e ou funcionamento normal do cérebro (Al-Harbi, Khan et al. 2017).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que até um terço dos adultos possuem níveis insuficientes de vitamina D (Briones and Darwish 2012, Nossov, Dines et al. 2014) e há uma forte associação entre a baixa concentração de vitamina D e a depressão (Collin, Assmann et al. 2016). Além disso, tem-se demonstrado que a vitamina D está envolvida em processos associados com a neurogênese durante o desenvolvimento e têm papéis bem conhecidos no metabolismo do  $Ca^{2+}$ , na saúde dos ossos, no sistema imune e no desenvolvimento do cérebro (Dougherty, Dilisio et al. 2016, Pang, Qi et al. 2016). Uma associação entre baixas concentrações de vitamina D e prejuízos em funções cognitivas, como função executiva, memória e orientação, é relatada em humanos, bem como o diagnóstico de demência e de doença de Alzheimer (Annweiler, Allali et al. 2009, Llewellyn, Langa et al. 2009). Um estudo que avaliou 139 residentes de clínicas de repouso com históricos de quedas e deficientes em vitamina D, demonstrou que a

suplementação de vitamina D foi capaz de melhorar a atenção e o tempo de reação desses pacientes após 6 meses de suplementação (Dhesi, Jackson et al. 2004). Outro estudo mostrou que a suplementação por 4 semanas de vitamina D em 25 residentes de casas de saúde, nos Estados Unidos, apresentou uma pequena melhora no desempenho do desenho do relógio nesses pacientes, porém, na fluência verbal, o mesmo não foi relatado (Buell, Scott et al. 2009, Buell, Dawson-Hughes et al. 2010).

Portanto, o baixo nível de vitamina D durante a vida adulta também pode estar ligado à deficiência cognitiva e a doenças neurodegenerativas, além de transtornos neuropsiquiátricos (Groves, McGrath et al. 2014, Cheng, Xia et al. 2016, Collin, Assmann et al. 2016). A vitamina D tem um papel imunomodulador através de suas ações anti-inflamatórias e anti-autoimunes. No SNC, a vitamina D está envolvida na regulação da excitotoxicidade neuronal mediada por  $Ca^{2+}$ , na redução do estresse oxidativo e na indução de proteínas estruturais sinápticas como os fatores neurotróficos e neurotransmissores que se encontram deficientes. A exposição reduzida à luz solar e a baixa ingestão de alimentos podem levar à deficiência de vitamina D. Evidências crescentes apontam o impacto da deficiência de vitamina D como fator favorecedor de várias doenças neurológicas centrais ou periféricas, especialmente a EM e várias doenças neurodegenerativas (Kesby, Eyles et al. 2011, Wrzosek, Lukaszkiwicz et al. 2013, Briones and Darwish 2014, Groves, McGrath et al. 2014, Annweiler, Bartha et al. 2015, Sundstrom and Salzer 2015). Quando examinadas as alterações da expressão gênica em neurônios envelhecidos, postula-se que os mecanismos subjacentes ao envelhecimento do SNC envolvem a instabilidade genômica, a disfunção neuroendócrina, a produção de compostos oxidativos, a alteração no metabolismo de  $Ca^{2+}$  e o dano neuronal inflamatório. O hormônio calciferol e o VDR podem ter um efeito regulador na maioria desses mecanismos de envelhecimento (Lee, Weindruch et al. 2000, Tuohimaa, Keisala et al. 2009). Neste sentido, torna-se relevante a investigação do papel da vitamina D durante a evolução da fase jovem à idosa, podendo ser um alvo terapêutico essencial aos danos cognitivos causados pelo envelhecimento.

## 1.5 Justificativa

Em relação às alterações cognitivas no processo de envelhecimento, estudos indicam que a perda da memória é uma das principais queixas dos idosos (Matchar, Chei et al. 2016). Dessa forma, evitar a perda considerável da memória no idoso é uma das prioridades para que, os indivíduos com idade avançada, possam manter-se independentes de seus familiares e capazes de realizar todas as atividades cotidianas, ou seja, para que os mesmos possam desfrutar de uma melhor qualidade de vida no envelhecimento tendo maior autonomia diante de suas funções diárias (Scherling, Wilkins et al. 2016). Pesquisas vêm buscando esclarecer o potencial da vitamina D nos processos de memória e o efeito neuroprotetor da mesma em patologias. Entretanto, seu real efeito sobre os processos de manutenção da memória no envelhecimento, bem como seu mecanismo de ação, ainda permanecem obscuros (Lichtenstein, Ferreira-Junior et al. 2013). Neste sentido, torna-se necessário ampliar as pesquisas que visam trazer maior conforto e melhor desempenho cognitivo durante o envelhecimento, uma vez que estimativas apontam para um aumento considerável da população idosa em nível mundial. Portanto, este trabalho visa investigar o papel da vitamina D no processo de envelhecimento em ratos *Wistar*.

## 2. Objetivos gerais

Avaliar o efeito da administração da vitamina D (1 $\alpha$ - 25 Dihidroxitamina D3) sobre parâmetros neuroquímico e comportamental em ratos *Wistar* em processo de envelhecimento.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com vitamina D na memória espacial através dos testes comportamentais do labirinto em Y em animais com 2, 6, 13 e 22 meses de idade;
- Avaliar o efeito do tratamento com vitamina D na memória espacial através do teste comportamental do labirinto octogonal em animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade;
- Avaliar o efeito do tratamento com vitamina D na memória de habituação ao campo aberto com o teste comportamental de habituação ao campo aberto em animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade;
- Verificar os níveis séricos de vitamina D no soro dos animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses.
- Avaliar os níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) em córtex frontal e hipocampo de ratos com 2, 6, 13, 22 e 31 meses, tratados com vitamina D;
- Avaliar os níveis de fatores neurotróficos BDNF e NGF em córtex frontal e hipocampo de ratos com 2, 6, 13, 22 e 31 meses, tratados com vitamina D;

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Desenho experimental

Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade procedentes do biotério da UNESC pesando aproximadamente 250 (2 e 6 meses) a 600g (13 a 31 meses), sendo que as idades de 13, 22 e 31 meses, correspondem, respectivamente, as idades de 45, 75 e 107 anos em humanos (Sengupta 2013). Os ratos permaneceram abrigados em 5 animais por caixa com acesso ao alimento e à água *ad libitum* e foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e temperatura de  $23\pm 1^\circ$  C. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, sob protocolo 087/2016-1.

#### 3.2. Tratamento crônico

Os animais foram tratados com vitamina D3 (Adera D3® – colicalciferol 3.300 UI/ml Laboratório Mantecorp Farmasa) nas doses de 42 ou 420 UI/kg por via oral (v.o.), foi diluído em água e administrado por gavagem, durante 21 dias (Briones and Darwish 2012). As gavagens foram administradas todos os dias às 10:00 h, com auxílio de uma agulha de gavagem com o máximo cuidado para evitar o estresse dos animais. Do 14º ao 22º dia foram submetidos aos testes comportamentais e, após o término do comportamento, no último dia, sofreram eutanásia e tiveram as estruturas do córtex frontal e hipocampo dissecadas do cérebro para as análises bioquímicas.

Os animais foram divididos em grupos experimentais baseados nas idades e nos tratamentos:

1. Animais com idade de 2 meses tratados com água v.o. por gavagem;
2. Animais com idade de 2 meses tratados com 42 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;
3. Animais com idade de 2 meses tratados com 420 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;
4. Animais com idade de 6 meses tratados com água v.o. por gavagem;
5. Animais com idade de 6 meses tratados com 42 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;

6. Animais com idade de 6 meses tratados com 420 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;
7. Animais com idade de 13 meses tratados com água v.o. por gavagem;
8. Animais com idade de 13 meses tratados com 42 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;
9. Animais com idade de 13 meses tratados com 420 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;
10. Animais com idade de 22 meses tratados com água v.o. por gavagem;
11. Animais com idade de 22 meses tratados com 42 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;
12. Animais com idade de 22 meses tratados com 420 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;
13. Animais com idade de 31 meses tratados com água v.o. por gavagem.
14. Animais com idade de 31 meses tratados com 42 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;
15. Animais com idade de 31 meses tratados com 420 UI/kg de vitamina D3 v.o. por gavagem;

Os testes comportamentais foram realizados em etapas, de acordo com as idades (figura 4 e 5):

**Etapa 1:** n=6-10 animais por grupo experimental, com idade de 2 meses foram avaliados nos testes do labirinto em Y, de habituação ao campo aberto e do labirinto octogonal;

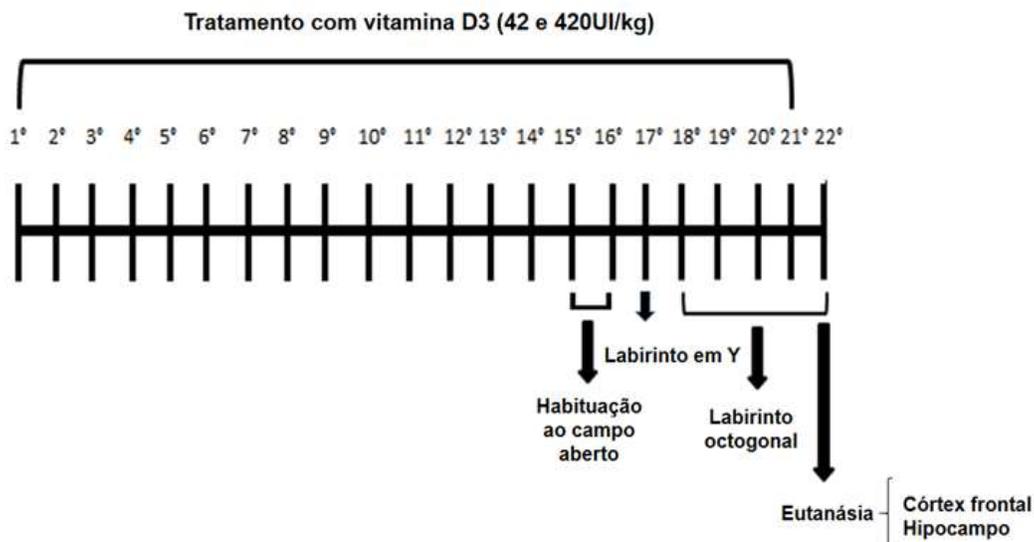
**Etapa 2:** n=8-15 animais por grupo experimental, com idade de 6 meses foram avaliados nos testes do labirinto em Y, de habituação ao campo aberto e do labirinto octogonal;

**Etapa 3:** n=9-13 animais por grupo experimental, com idade de 13 meses foram avaliados nos testes do labirinto em Y, de habituação ao campo aberto e do labirinto octogonal;

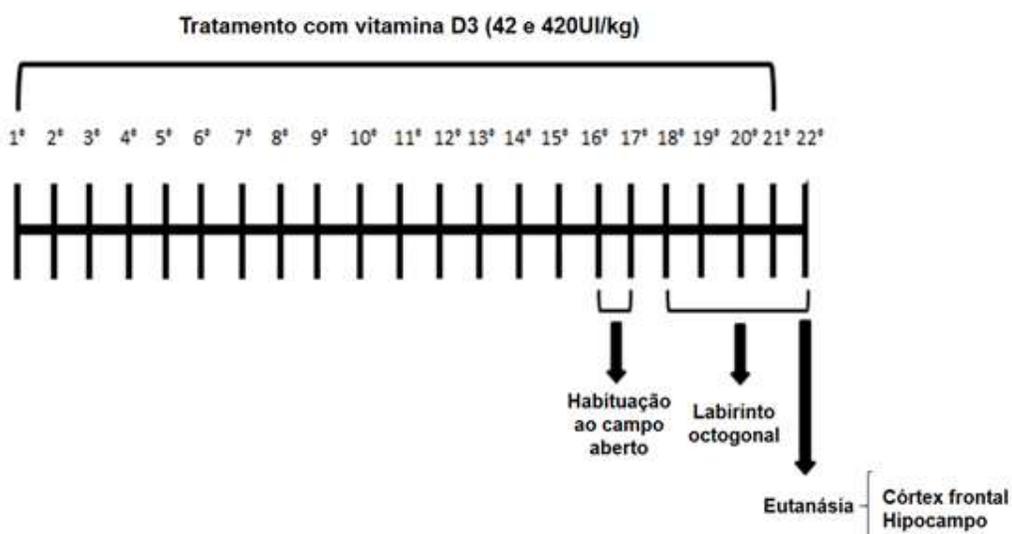
**Etapa 4:** n=10-11 animais por grupo experimental, com idade de 22 meses foram avaliados nos testes do labirinto em Y, de habituação ao campo aberto e no labirinto octogonal;

**Etapa 5:** n=4-7 animais por grupo experimental, com idade de 31 meses foram avaliados nos testes de habituação ao campo aberto e do labirinto octogonal.

O desenho experimental das etapas 1, 2, 3 e 4 estão representados na figura 4 e a etapa 5 na figura 5:



**Figura 4.** Desenho experimental. Etapas 1, 2, 3 e 4.



**Figura 5.** Desenho experimental. Etapas 5.

### 3.3 Testes comportamentais

#### 3.3.1 Labirinto em Y

Esse teste é realizado para avaliar a memória de reconhecimento espacial dos animais. O aparato comportamental é composto de material MDF preto e possui três

braços iguais (50 x 10 x 20 cm, cada braço) afastados em 120°. Este foi colocado em uma sala escura com iluminação de lâmpada vermelha, para deixar os animais mais confortáveis para explorar o aparato (Deacon and Rawlins 2006) e com dicas visuais nas paredes do braço para facilitar a localização espacial dos animais. O protocolo consiste de duas sessões separadas por um intervalo de 2 horas. 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 estava bloqueado por uma porta guilhotina. Após os 5 minutos os animais retornaram à caixa moradia. Depois de 2 horas, na segunda sessão, o animal foi novamente colocado no braço de “partida” do labirinto para explorar livremente os três braços durante 5 min, já com o braço que estava fechado anteriormente, chamado de braço “novo” disponível para exploração. O tempo de permanência em cada braço foi registrado, para avaliar a preferência dos animais por explorar o braço “novo” que não pôde ser explorado na primeira sessão (Dellu, Fauchey et al. 1997).

### **3.3.2 Teste de habituação ao campo aberto**

Para avaliar a memória de habituação, no 16º dia de tratamento, os animais foram colocados no aparato de habituação ao campo aberto. Este aparato consiste em uma caixa com 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 9 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Na sessão de treino, os animais foram, cuidadosamente, colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual pôde explorar livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após o término dos cinco minutos, os animais foram devolvidos para a caixa moradia. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino (15º dia de tratamento) na qual se repetiu o procedimento do treino. Foram aferidos os números de “cruzamentos” através das linhas pretas e o número de “levantamentos” contabilizados a partir do número de vezes que o animal permaneceu de pé nas duas patas traseiras, esses parâmetros foram avaliados em ambas as sessões (Vianna, Alonso et al. 2000). Ao final, com este teste comportamental, foi avaliada a memória de habituação ao campo aberto nesses animais.

### 3.3.3 Labirinto octogonal

Este teste comportamental é realizado para aferir a memória espacial dos animais. O animal foi colocado no aparato do labirinto octogonal, um aparato de 8 braços, numerados de 1 a 8 ( $48 \times 12$  cm), que se estende radialmente a partir de uma área central (32 cm de diâmetro). O aparelho foi colocado 50 cm acima do chão, e continha formas geométricas posicionadas ao final do braço onde foi colocada a recompensa. Dessa forma, o animal foi colocado neste aparato durante 10 minutos no primeiro dia de teste apenas para se habituar ao aparato, retornando, em seguida à caixa moradia, onde foram colocados, aproximadamente, 2 cereais de chocolate (Nescau Cereal®) por animal para se habituarem a comida e, depois, permaneceram por 22 horas sem ração. No segundo dia de teste ou 19º de tratamento o animal foi colocado novamente no aparato, porém, já havia recompensa (cereal de chocolate) em quatro dos oito braços do labirinto. Nos braços em que foram colocadas as recompensas, haviam as pistas geométricas. Foram anotadas as entradas em cada braço, assim como, medido o tempo que cada animal demorou para encontrar os 4 cereais de chocolate, assim que o animal havia encontrado as 4 recompensas era retirado do aparato e devolvido à caixa moradia. Após retornarem a caixa moradia, os animais recebiam a ração do biotério e tinham a ração durante 2 horas disponível para alimentarem-se, após foi colocado novamente 2 cereais de chocolate por animal e a ração do biotério foi retirada, assim os ratos permaneceram em jejum durante as 22 horas subsequentes. O mesmo procedimento foi realizado no 20º, 21º e 22º dias. Após o término do teste, os animais foram submetidos à eutanásia (Foyet, Hritcu et al. 2011, Hritcu, Cioanca et al. 2012). Através deste teste comportamental foram aferidos os seguintes parâmetros: erros totais e o tempo total (latência) que obtiveram para encontrarem a recompensa nos 4 braços, avaliando a memória espacial dos ratos (Packard and White 1991).

### 3.3.4. Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia no 22º dia do experimento, logo após a avaliação comportamental, por decapitação na guilhotina. Os animais ficaram aguardando a eutanásia na sala ao lado para evitar que sentissem o cheiro do sangue e a guilhotina foi lavada em água corrente entre cada eutanásia. O córtex frontal e hipocampo

foram dissecados para posteriores análises bioquímicas. As amostras foram armazenadas com refrigeração à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4 Análises Bioquímicas**

#### **3.4.1 Análise dos níveis de vitamina D3 no soro**

Os níveis de 25(OH) D3 foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) realizada pelo laboratório Pasteur da cidade de Criciúma/SC, em amostras de soro dos animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade.

#### **3.4.2 Análise dos níveis de citocinas e fatores neurotróficos**

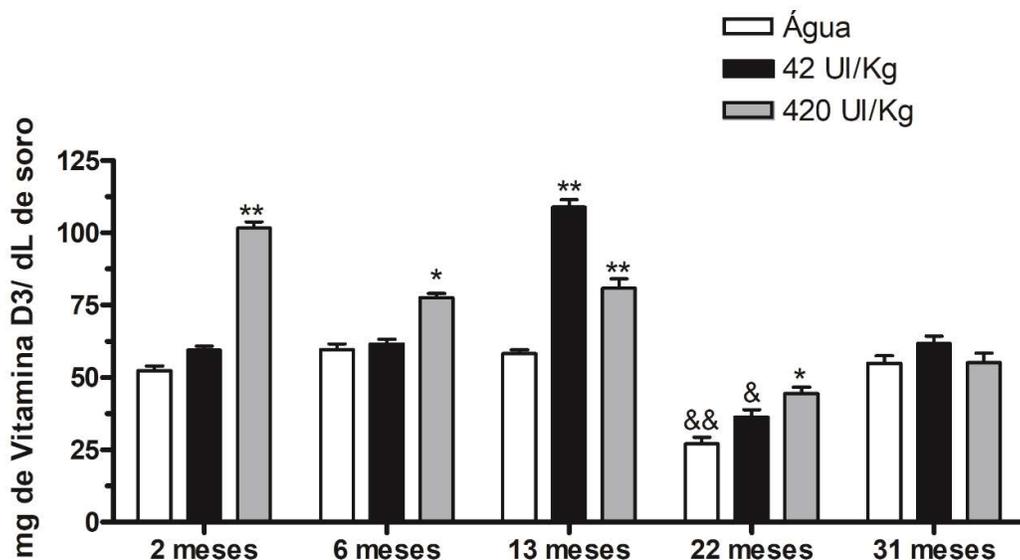
Amostras de córtex frontal e hipocampo foram homogeneizadas em tampão fosfato. Os níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) e de fatores neurotróficos (NGF e BDNF) foram quantificadas por kits de imunensaio enzimático enzimático (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), conforme as recomendações do fabricante, descritas a seguir. As placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram incubadas durante a noite com o anticorpo de captura. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de lavagem, e em seguida, foram bloqueadas com uma solução de tampão fosfato com albumina 1% durante 1 hora. Após, foram incubadas as amostras homogeneizadas e a curva padrão, diluídas em solução tampão, durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e, em seguida, incubadas com anticorpo de detecção por mais 2 horas. Depois das lavagens, foi incubado uma peroxidase conjugada com estreptavidina por 20 minutos, e após o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1), e a reação foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 2N. As placas foram lidas à 450nm em espectrofotômetro. A proteína total foi mensurada de acordo com o método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

### 3.5. Análise estatística

As dosagens dos níveis dos fatores neurotróficos (BDNF, NGF), das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) e a dosagem das concentrações de vitamina D3 no soro, foram avaliados por análise de variância de uma via (ANOVA) e o teste *post hoc* de Duncan foi realizado, quando apropriado. Os dados do labirinto octogonal foram avaliados por ANOVA de uma via de medidas repetidas e quando o valor de *F* foi significativo, foram realizadas comparações entre os grupos pelo teste *post hoc* de Duncan. Os dados do labirinto em Y e do teste de habituação ao campo aberto, foram analisados pelo teste *T* de *Student* para amostras dependentes. A significância estatística foi considerada para os valores de *p* menores que 0,05.

## 4 Resultados

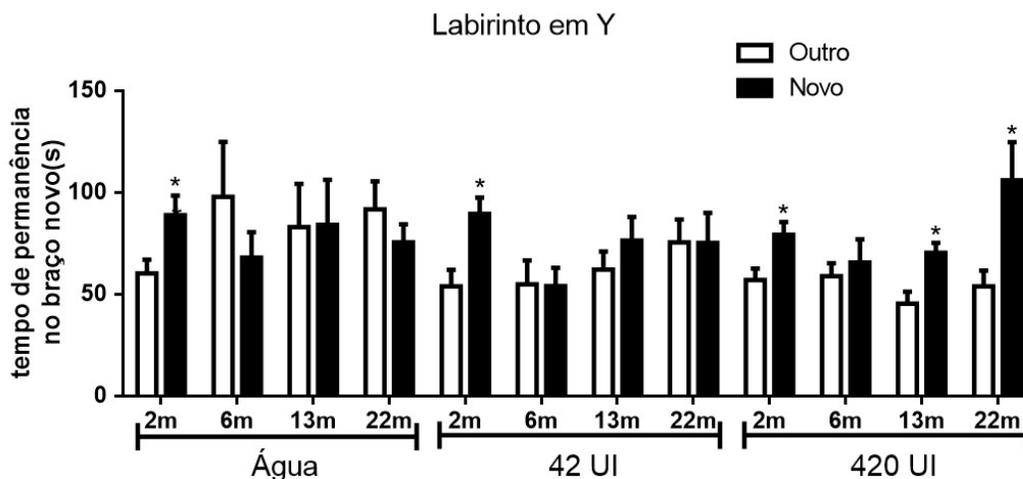
Os resultados da figura 6 mostram os níveis de vitamina D3 no soro dos animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade. A análise de variância de uma via (ANOVA) revelou diferença significativa [F(1,14):16,12 (p<0,01)] e o teste *post hoc* de Duncan mostrou que a dose de 420 UI/kg aumentou os níveis de vitamina D3 nos animais de 2, 6, 13 e de 22 meses, quando comparados ao grupo controle (água) dentro de cada idade. A dose de 42 UI/kg (p<0,01), aumentou os níveis de vitamina D3 apenas na idade de 13 meses. Na idade de 22 meses os níveis de vitamina D3 nos grupos controle (água) e 42 UI/kg estavam abaixo do nível encontrado no soro dos animais com 2 meses. Os animais de 31 meses não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos três grupos experimentais avaliados (figura 6).



**Figura 6.** Avaliação dos níveis de vitamina D3 no soro de animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses suplementados com vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) por 21 dias. A dosagem foi avaliada através do HPLC. n= 4-10 animais por grupo experimental. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via e o teste *post hoc* de Duncan foi realizado quando apropriado. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram \*p<0,05 ou \*\*p<0,01 quando comparado ao grupo controle (água) dentro de cada idade. &p<0,05 &&p<0,01 quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

Os dados do labirinto em Y (figura 7) foram analisados pelo teste *T* de *Student* para amostras dependentes quanto ao tempo de permanência entre os braços “outro” e “novo” para animais com 2, 6, 13 ou 22 meses de idade administrados ou não com

vitamina D3 (42 ou 420 UI/kg). Os animais com 31 meses não foram submetidos ao labirinto em Y devido ao número reduzido de animais nesta idade. Os animais com idade de 2 meses dos grupos suplementados com vitamina D3 nas doses de 42 e 420 UI/kg [ $t(1,9) = 2,94$ ;  $p < 0,05$ ] e [ $t(1,12) = 2,34$ ;  $p < 0,05$ ], respectivamente, demonstraram desempenho semelhante ao grupo que recebeu água [ $t(1,6) = 2,64$ ;  $p < 0,05$ ]. Todos se mantiveram por maior tempo explorando o “braço novo” quando comparado ao “outro braço” do aparato durante o teste, demonstrando que souberam se localizar espacialmente e reconhecer qual era o braço novo. Já os animais com 6 meses de idade, não apresentaram, em nenhum dos três grupos (água, 42 e 420 UI/kg), diferenças significativas entre o tempo de exploração nos dois braços avaliados. Os animais mantiveram a exploração semelhante no “braço novo” e no “outro braço”, demonstrando não reconhecer o novo ambiente (braço novo). Os animais com 13 e 22 meses de idade apresentaram dano de memória espacial nos grupos que receberam água, e a vitamina D3, na dose de 42 UI/kg para as idades de 13 meses e 22 meses, não foi capaz de reverter esse dano, porém, a dose de 420 UI/kg foi capaz de reverter esse dano, tanto na idade de 13 [ $t(1,11) = 3,40$ ;  $p < 0,05$ ], quanto na de 22 meses [ $t(1,10) = 2,80$ ;  $p < 0,05$ ], uma vez que os animais apresentaram maior tempo de permanência no “braço novo”. Desta forma, a vitamina D3 na dose de 420 UI/kg foi capaz de reverter o dano na memória espacial causado pelo envelhecimento nas idades de 13 e 22 meses e manteve o mesmo efeito nos três grupos na idade de 2 meses (figura 7).

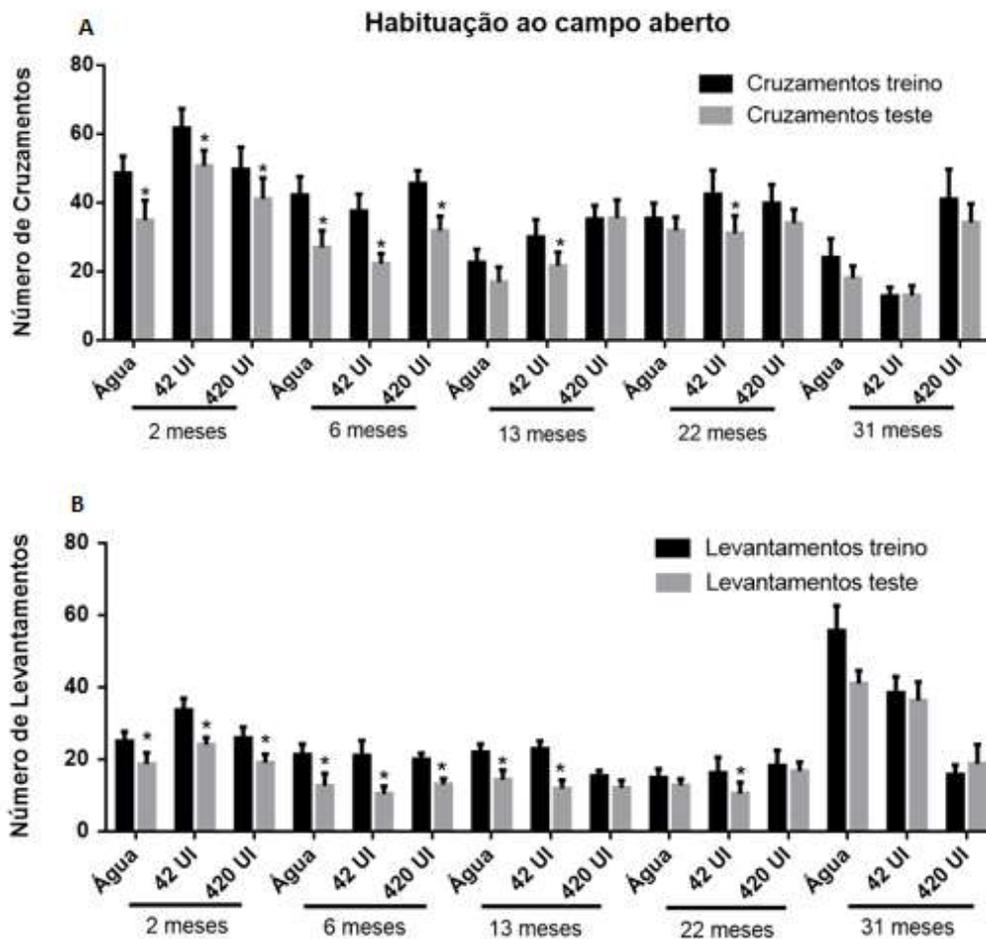


**Figura 7:** Efeito da suplementação com vitamina D3 nas doses de 42 UI/kg e 420 UI/kg no teste de labirinto em Y em ratos *Wistars* machos com idades de 2, 6, 13 ou 22 meses. A figura mostra o tempo de exploração em segundos em cada braço do labirinto em Y: “outro” e “novo”. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 7-13 animais por grupo, \* $p < 0,05$  quando comparado com o “outro” braço.

Os dados do teste de habituação ao campo aberto foram analisados pelo teste T de *Student* para amostras dependentes. A figura 8 (A e B) mostra os resultados da memória de habituação avaliada pelo teste de habituação ao campo aberto referentes ao número de cruzamentos e levantamentos, respectivamente, entre o treino e o teste de animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade.

Os animais com 2 meses apresentaram desempenho semelhante, quanto ao número de cruzamentos (figura 8 A), nos três grupos (água [ $t(1,10) = 4,57$ ;  $p < 0,05$ ]; 42 UI/kg [ $t(1,9) = 2,45$ ;  $p > 0,05$ ] ou 420 UI/kg [ $t(1,8) = 3,24$ ;  $p > 0,05$ ]), todos diminuíram o número de cruzamentos entre o treino e o teste. O mesmo padrão de comportamento foi observado com os animais de 6 meses tanto no grupo controle (água [ $t(1,9) = 3,55$ ;  $p < 0,05$ ]) quanto nos grupos suplementados com vitamina D3 42 UI/kg ([ $t(1,6) = 3,09$ ;  $p < 0,05$ ]) e 420 UI/kg ([ $t(1,15) = 3,45$ ;  $p > 0,05$ ]). Nas idades de 13 e 22 meses os animais controle (água) e os suplementados com vitamina D3 na dose de 420 UI/kg, apresentaram dano na memória de habituação, não diminuindo o número de cruzamentos entre treino e teste. Já a dose de 42 UI/kg [ $t(1,22) = 2,51$ ;  $p < 0,05$ ] foi capaz de reverter o dano causado pelo envelhecimento nessas idades. A idade de 31 meses apresentou dano na memória de habituação nos três grupos.

Em relação ao número de levantamentos (figura 8 B) as idades de 2 meses (água [ $t(1,10) = 2,79$ ;  $p < 0,05$ ]; 42 UI/kg [ $t(1,9) = 3,43$ ;  $p > 0,05$ ] e 420 UI/kg [ $t(1,8) = 3,14$ ;  $p < 0,05$ ]) e de 6 meses (água [ $t(1,9) = 2,88$ ;  $p < 0,05$ ]; 42 UI/kg [ $t(1,6) = 3,23$ ;  $p < 0,05$ ] e 420 UI/kg [ $t(1,15) = 3,65$ ;  $p < 0,05$ ]) mantiveram o mesmo desempenho apresentado no cruzamento, ou seja, todos aprenderam diminuindo a exploração no aparato. Os animais com 13 meses de idade diminuíram os números de levantamentos no grupo controle água [ $t(1,19) = 3,30$ ;  $p < 0,05$ ] e no grupo tratado com vitamina D3 na dose de 42 UI/kg [ $t(1,22) = 3,88$ ;  $p < 0,05$ ], já a dose de 420 UI/kg, não apresentou resultado significativo entre treino e teste. Os animais com idade de 22 meses mantiveram o mesmo padrão já apresentado no cruzamento, sendo que a dose de 42 UI/kg [ $t(1,9) = 3,41$ ;  $p < 0,05$ ] foi capaz de reverter o dano apresentado no grupo controle (água) [ $t(1,8) = 1,21$ ;  $p = 0,25$ ] e a dose de 420 UI/kg não se mostrou capaz de reverter este efeito. E, por fim, os animais com 31 meses não apresentaram resultados significativos em nenhum dos três grupos.



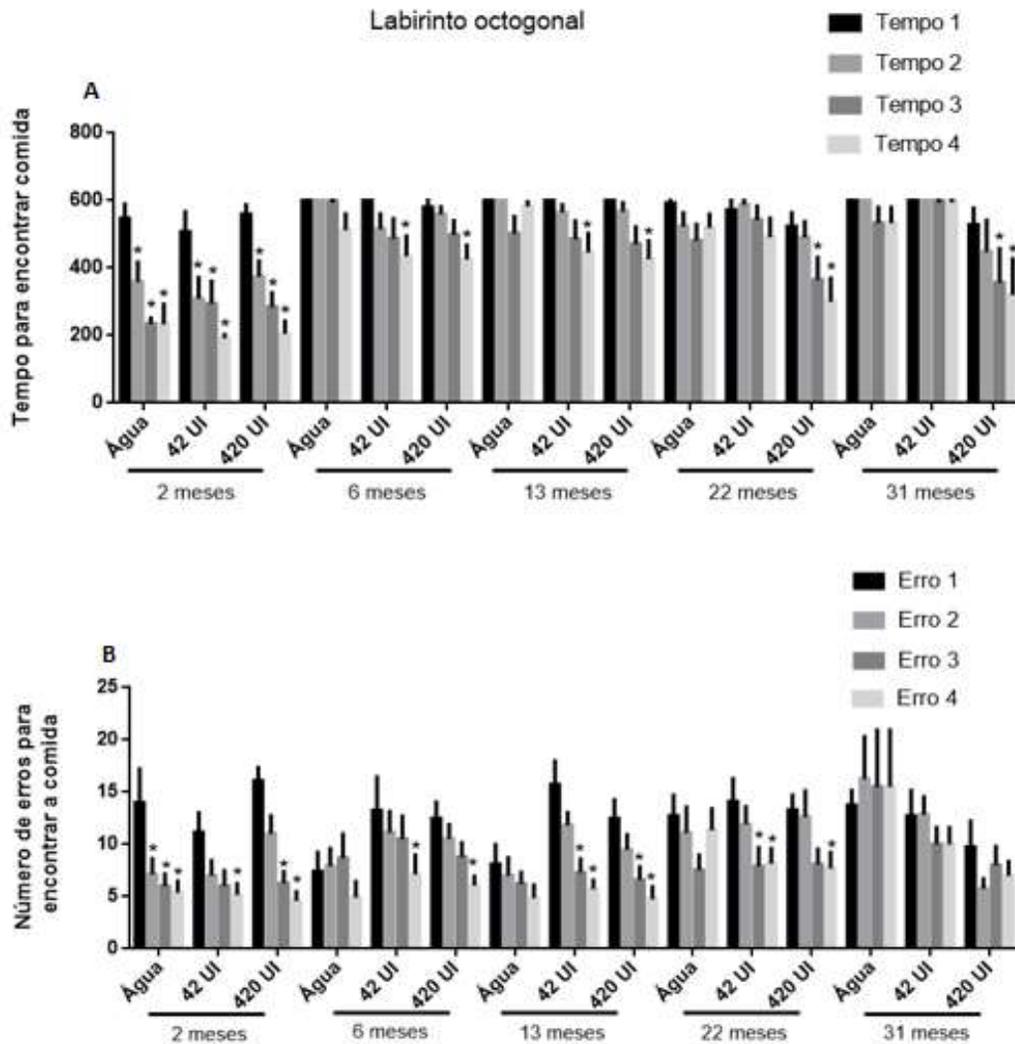
**Figura 8 A e B:** Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) por 21 dias em animais com 2, 6, 13, 22 ou 31 meses de idade no teste de habituação ao campo aberto. (A) apresenta o número de cruzamentos e (B) número de levantamentos avaliados na sessão treino e teste. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM com  $n = 4-13$  animais por grupo experimental. Foram considerados significativos os resultados que apresentaram  $*p < 0,05$  quando comparados no mesmo grupo experimental entre a sessão teste e treino.

Na figura 9 (A e B), encontram-se os resultados do labirinto octogonal. A análise de variância (ANOVA) de uma via de medidas repetidas revelou diferença significativa na interação entre os grupos nas repetições em relação à latência (tempo) para encontrar a recompensa [ $F(3,42) = 2,19; p < 0,001$ ] e os erros totais para encontrar a recompensa [ $F(3,42) = 27,87; p < 0,05$ ].

O teste *post hoc* de Duncan revelou diferenças significativas quando observado o tempo (figura 9 A) para encontrar a recompensa nos grupos controle (água), 42 e 420 UI/kg de vitamina D3 nos animais com 2 meses de idade. As diferenças foram significativas nos 2º, 3º e 4º dias de teste, dessa forma os animais demonstraram estar com a memória espacial conservada, pois a cada dia foram diminuindo o tempo para

encontrar a recompensa. Já os animais de 6 e 13 meses de idade apresentaram dano de memória espacial no grupo controle (água) sendo revertido pelas doses de 42 e 420 UI/kg de vitamina D3, porém, isso ocorreu apenas no 4º dia do teste. Os animais com idade de 22 e 31 meses também apresentaram dano de memória espacial tanto nos grupos controles (água), quanto nos tratados com 42 UI/kg de vitamina D3. Entretanto, a dose de 420 UI/kg foi capaz de reverter esse dano no 3º e 4º dias de teste em ambas as idades (figura 9 A).

Quando avaliado o número total de erros (figura 9 B) para encontrar a recompensa, o teste *post hoc* de Duncan mostrou diferenças significativas na idade de 2 meses no 2º, 3º e 4º dias de teste, quando comparados ao 1º dia, no grupo controle (água). No grupo tratado com 42 UI/kg de vitamina D3, apenas foram diminuídos os erros no 4º dia de teste e a dose 420 UI/kg apresentou um melhor desempenho no 3º e 4º dias de teste. Os animais com 6, 13, 22 e 31 meses de idade que receberam água, apresentaram dano de memória não diminuindo o número de erros ao longo dos dias de teste. Na idade de 6 meses houve redução significativa no número de erros no 4º dia dos grupos tratados com 42 e 420 UI/kg de vitamina D3. Já, os animais com 13 meses de idade tratados com a dose de 42 e 420 UI/kg de vitamina D3, diminuíram os erros no 3º e 4º dias de teste quando comparados ao 1º dia dentro de cada grupo tratado. Com a idade de 22 meses a vitamina D3 na dose de 42 UI/kg foi capaz de reduzir o número de erros no 3º e 4º dias de teste, porém, o grupo tratado com 420 UI/kg apenas diminuiu os erros no último dia de teste. Contudo, os animais com idade de 31 meses apresentaram dano em todos os tratamentos não havendo diminuição de erros dentro de nenhum dos grupos ao longo dos 4 dias (figura 9 B).



**Figura 9 A e B:** Efeito do tratamento com vitamina D (42 e 420 UI/kg) por 21 dias em animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses na memória espacial avaliada no teste do labirinto octogonal. (A) tempo para encontrar a recompensa e (B) número de erros para encontrar a recompensa no 1º, 2º, 3º e 4º dias de teste, com  $n=4-13$  animais por grupo experimental. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via de medidas repetidas e o teste *post hoc* de Duncan foi realizado quando apropriado. \* $p<0,05$  quando comparado dentro do mesmo grupo experimental com o primeiro dia de teste.

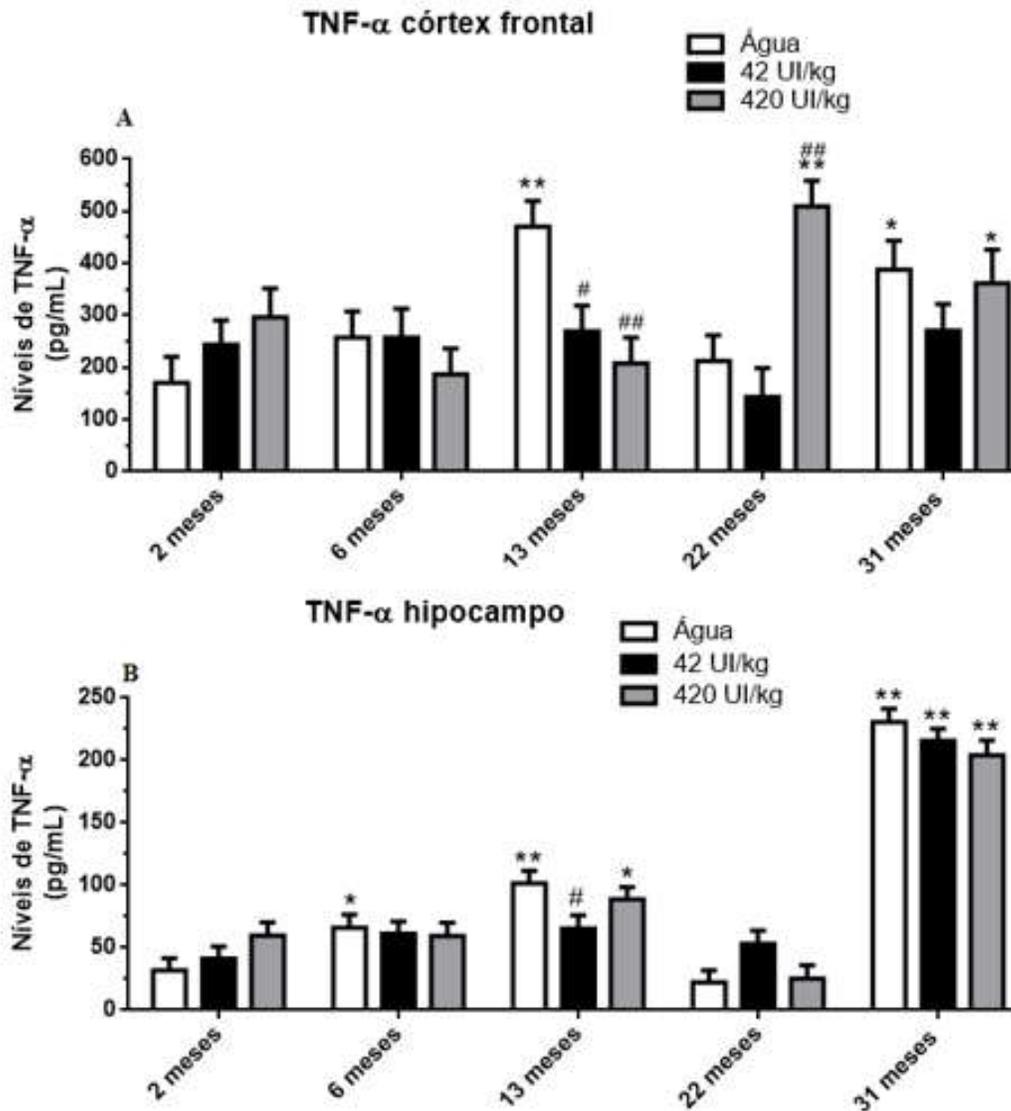
Para avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, BDNF e NGF no córtex frontal e hipocampo dos ratos tratados ou não com vitamina D3 em diferentes idades, foi utilizada a ANOVA de uma via e o teste de *post hoc* de Duncam foi aplicado quando apropriado.

Na figura 10 (A e B) estão representados, respectivamente, os resultados dos níveis de TNF- $\alpha$  no córtex frontal e no hipocampo. A ANOVA de uma via revelou

diferenças significativas para os níveis de TNF- $\alpha$  no córtex frontal (figura 10 A) [F (1,14) = 4,28; p<0,001] e hipocampo (figura 10 B) [F (1,14) = 44,98; p<0,001].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que no córtex frontal, os níveis de TNF- $\alpha$  encontravam-se aumentados no grupo controle (água) com idade de 13 meses e a vitamina D3 42 UI/kg (p<0,05) e 420 UI/kg (p<0,01) foram capazes de reverter este efeito. Além disso, foi observado aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em animais com 22 meses que receberam vitamina D3 420 UI/kg. Os animais com 31 meses mostraram aumento dos níveis desta citocina e o tratamento com vitamina D3 não reverteu este efeito (figura 10 A).

No hipocampo (figura 10 B), foi observado o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em animais com 6 meses e com 13 meses. Apenas a dose de 42 UI/kg (p<0,01) reverteu este efeito. Os animais com 31 meses mostraram aumento desta citocina, porém, a vitamina D3 não foi capaz de reverter este efeito.



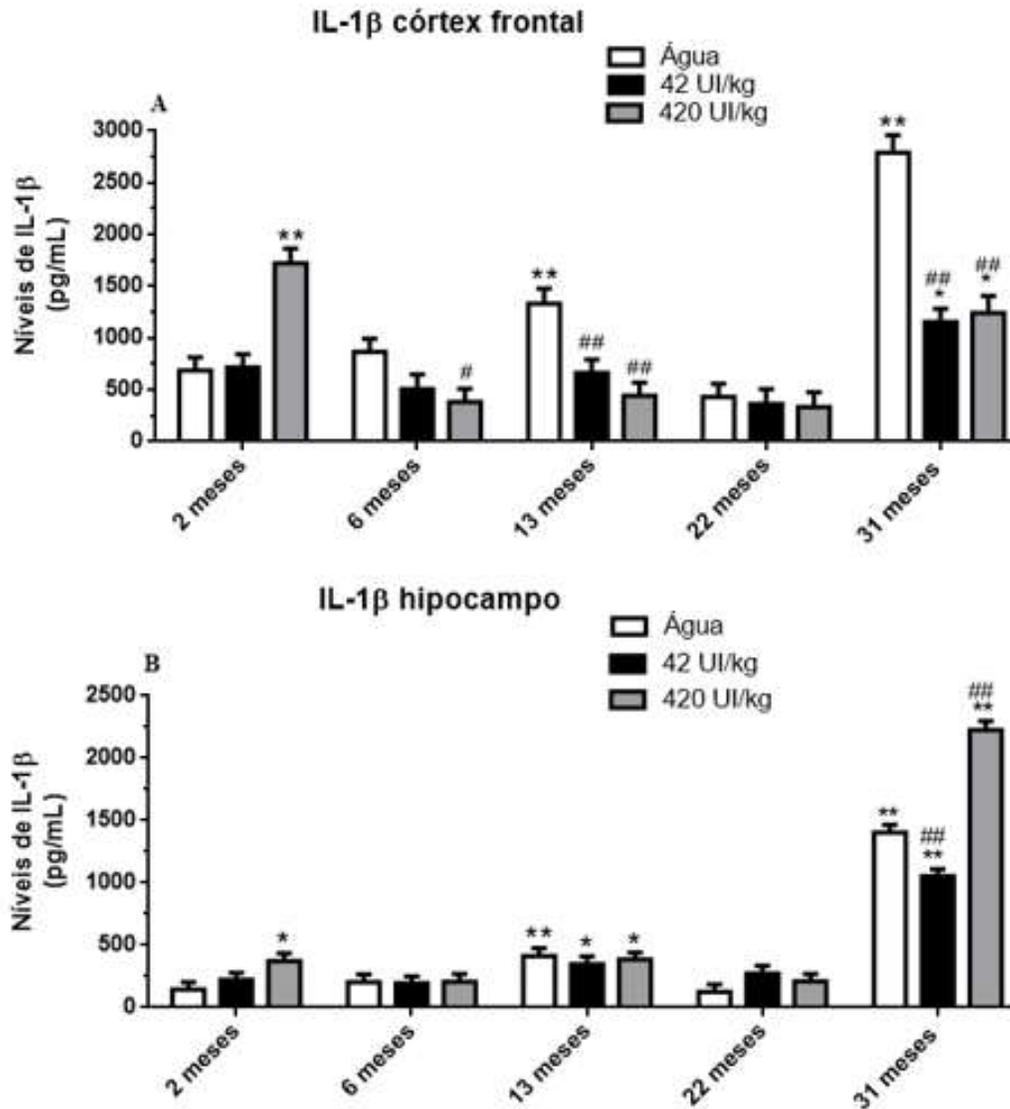
**Figura 10 A e B:** Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420UI/kg) durante 21 dias nos níveis de TNF- $\alpha$  em estruturas cerebrais do córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos *Wistar*. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 3-6 animais por grupo, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

Os níveis de IL-1 $\beta$ , representados na figura 11 (A e B), apresentaram diferenças estatísticas no córtex frontal [ $F(1,14) = 4,28$ ;  $p < 0,001$ ] e no hipocampo [ $F(1,14) = 82,25$ ;  $p < 0,001$ ].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que no córtex frontal (figura 11 A) dos animais com 2 meses tratados com a dose de 420 UI/kg ( $p < 0,001$ ) de vitamina D3, houve aumento significativo de IL-1 $\beta$  quando comparados aos animais controle (água) dentro da mesma idade, e, a dose de 42 UI/kg, não alterou os níveis desta citocina. No córtex

frontal dos animais com 13 e 31 meses foi possível observar um aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  nos grupos controles (água) de cada idade, quando comparados ao controle (água) de 2 meses. A dose de 420 UI/kg foi capaz de reverter esse aumento em ambas as idades: 13 ( $p<0,001$ ) e 31 meses ( $p<0,001$ ). A dose de 42 UI/kg também reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  nas idades de 13 ( $p<0,01$ ) e 31 meses ( $p<0,001$ ). Na idade de 6 meses, os animais tratados com vitamina D3 420 UI/kg, reduziu os níveis de IL-1 $\beta$ , quando comparado ao controle 2 meses. Ainda no córtex frontal, na idade de 22 meses, não foram observadas diferenças significativas (figura 11 A).

No hipocampo (figura 11 B) dos animais de 2 meses tratados com a dose de 420 UI/kg de vitamina D, houve aumento significativo de IL-1 $\beta$  quando comparados aos animais controle (água) dentro da mesma idade e, a dose de 42 UI/kg, não mostrou resultado significativo. Os animais com idade de 31 meses apresentaram níveis aumentados de IL-1 $\beta$  quando comparados ao grupo controle (água) de 2 meses, a dose de 42 UI/kg ( $p<0,001$ ) foi capaz de reduzir os níveis desta citocina, já a dose de 420 UI/kg ( $p<0,001$ ) aumentou estes níveis quando comparado ao grupo controle (água) dentro da mesma idade. Os animais com 13 meses controle, vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) apresentaram os níveis de IL-1 $\beta$  aumentados (figura 11 B).



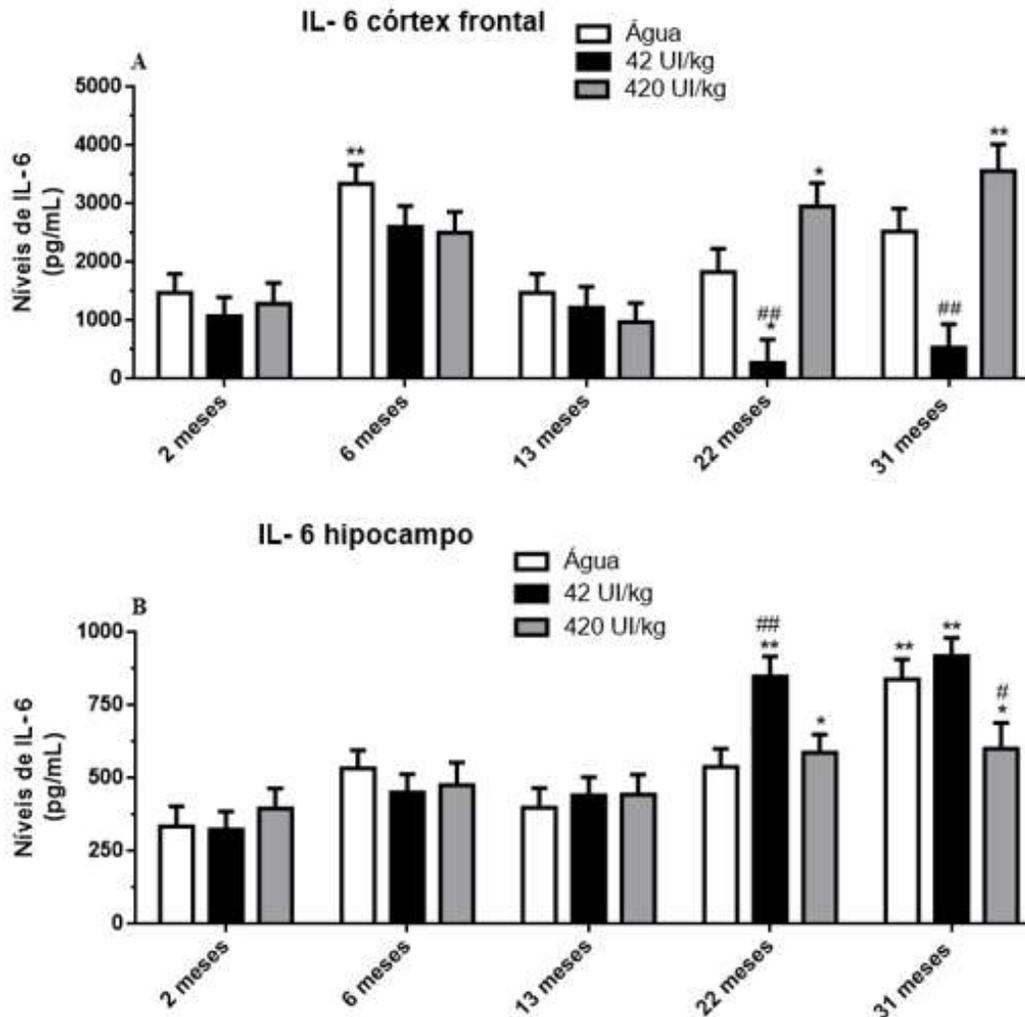
**Figura 11 A e B:** Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420UI/kg) durante 21 dias nos níveis de IL-1 $\beta$  em estruturas cerebrais do córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistars. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 3-6 animais por grupo, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

A interleucina IL-6 tem seus níveis representados nas estruturas do córtex frontal [ $F(1,14) = 7,23$ ;  $p < 0,001$ ] e hipocampo [ $F(1,14) = 8,10$ ;  $p < 0,001$ ] na figura 12 (A e B).

Na estrutura do córtex frontal (figura 12 A), não houve diferença estatística nas idades de 2, 6 e 13 meses dentro das idades. Somente houve aumento de IL-6 no grupo controle 6 meses. Na idade de 22 meses a dose de 42 UI/kg ( $p < 0,05$ ) diminuiu os níveis de IL-6 quando comparado ao grupo controle (água) dentro da mesma idade, o

mesmo não ocorreu na dose de 420 UI/kg. Ainda no córtex frontal, os animais com idade de 31 meses apresentaram diferenças estatísticas na dose de 42 UI/kg ( $p < 0,01$ ), sendo esta capaz de reduzir os níveis de IL-6, enquanto que a dose de 420 UI/kg, não apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo controle (água) dentro da mesma idade. Porém, houve aumento de IL-6 em animais com idade de 31 meses tratados com 420 UI/kg quando comparado com o controle 2 meses (figura 12 A).

No hipocampo (figura 12 B), as idades de 2, 6 e 13 meses, não apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos grupos tratados quando comparados ao controle (água) dentro da mesma idade. Nos animais de 22 meses, os níveis de IL-6 foram aumentados com a dose de 42 UI/kg ( $p < 0,01$ ), e a dose de 420 UI/kg, não mostrou diferença significativa quando comparado ao grupo controle (água) dentro da mesma idade. A dose de 420 UI/kg ( $p < 0,05$ ) foi capaz de reduzir os níveis da IL-6 no hipocampo dos animais com 31 meses. No entanto, a dose de 42 UI/kg não apresentou resultado estatístico quando comparado ao grupo controle (água) dentro da mesma idade (figura 12 B).



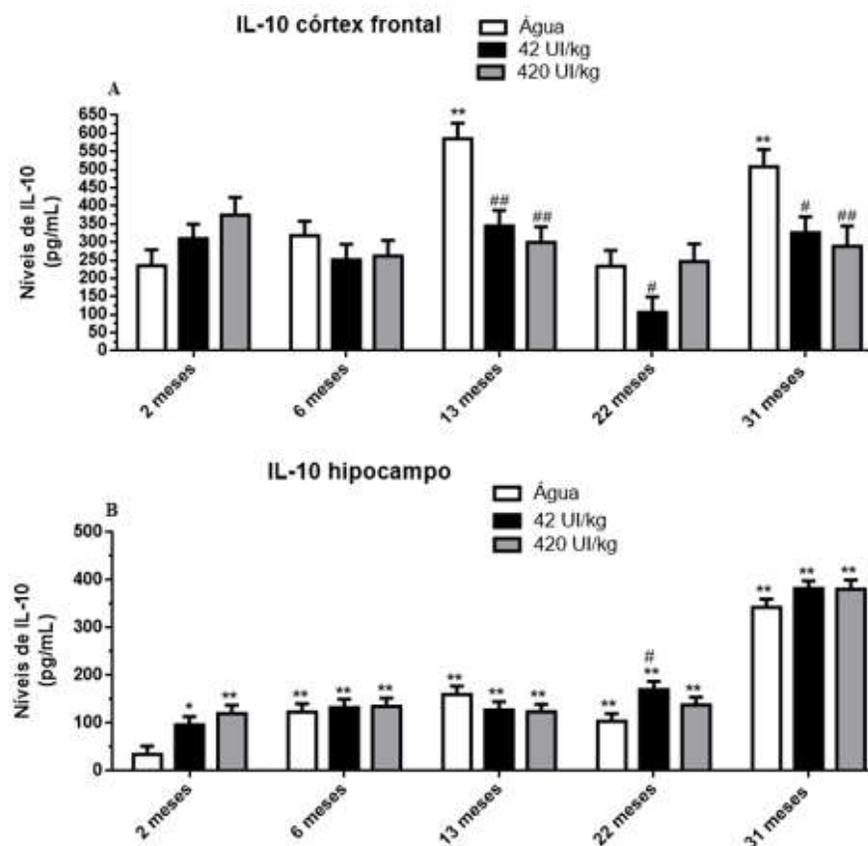
**Figura 12 A e B:** Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) durante 21 dias nos níveis de IL-6 em estruturas cerebrais do córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistars. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM com 3-6 animais por grupo, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

Os níveis de IL-10 nas estruturas do córtex frontal [ $F(1,14) = 6,63$ ;  $p < 0,01$ ] e hipocampo [ $F(1,14) = 37,47$ ;  $p < 0,01$ ], estão representados na figura 13 (A e B).

No córtex frontal (figura 13 A), as idades de 2 e 6 meses, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle (água) dentro da mesma idade. Nas idades de 13 e 31 meses, o grupo controle mostrou aumento dos níveis de IL-10 quando comparado ao controle (água) de 2 meses e, as duas doses de vitamina D3 (13 meses – 42 UI/kg ( $p < 0,001$ ) 420 UI/kg ( $p > 0,001$ )); (31 meses – 42 UI/kg ( $p < 0,05$ ) 420 UI/kg ( $p > 0,01$ )), foram capazes de diminuir esses níveis em ambas as idades. Na idade de 22 meses a dose de 42 UI/kg ( $p < 0,05$ ) foi capaz de diminuir os níveis de IL-10 quando

comparado ao grupo controle (água), dentro da mesma idade, o mesmo não ocorreu na dose maior de 420 UI/kg (figura 13 A).

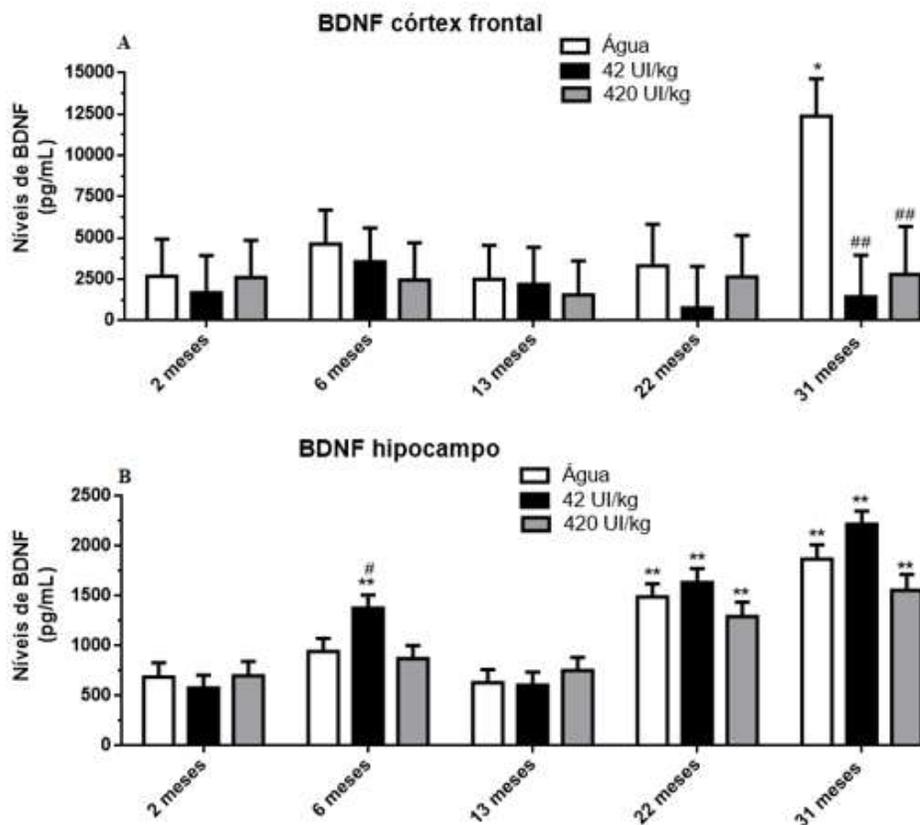
No hipocampo (figura 13 B), os animais com 2 meses mostraram aumento dos níveis de IL-10 tanto no grupo tratado com a dose de 42 UI/kg ( $p < 0,05$ ) quanto na dose de 420 UI/kg ( $p < 0,01$ ) quando comparados com o grupo controle (água) dentro da mesma idade. Nas demais idades, 6, 13, 22 e 31 meses todos os grupos experimentais apresentaram níveis aumentados de IL-10 quando comparados ao controle 2 meses. Os animais com 22 meses, a dose de 42 UI/kg ( $p < 0,05$ ) aumentou os níveis de IL-10 quando comparado ao grupo controle (água) dentro da mesma idade. Ainda no hipocampo, as idades de 6, 13 e 31 meses, em ambas as doses, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle (água) dentro de cada idade (figura 13 B).



**Figura 13 A e B:** Efeito do tratamento com vitamina D (42 e 420 UI/kg) durante 21 dias nos níveis de IL-10 em estruturas cerebrais do córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistars. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 3-6 animais por grupo, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

A figura 14 (A e B) apresenta os níveis de BDNF nas estruturas do córtex frontal [F(1,14)= 1,44; p<0,01) e hipocampo [F(1,14)= 14,95; p<0,001], respectivamente. No córtex frontal (figura 14 A), as idades de 2, 6, 13 e 22 meses não apresentaram resultados significativos. No entanto, na idade de 31 meses, os níveis de BDNF encontram-se aumentados no grupo controle (água) e as doses de 42 UI/kg (p<0,01) e 420 UI/kg (p<0,01) foram capazes de reverter este aumento.

No hipocampo (figura 14 B), os animais com idade de 6 meses mostram diferenças estatísticas. A dose de 42 UI/kg (p<0,05) de vitamina D3 foi capaz de elevar os níveis de BDNF quando comparado ao grupo controle (água) de 6 meses e de 2 meses, enquanto que a maior dose não apresentou resultados significativos. Ainda no hipocampo, os animais com 22 e 31 meses, em todos os grupos experimentais, mostraram níveis aumentados de BDNF em relação ao grupo controle 2 meses.

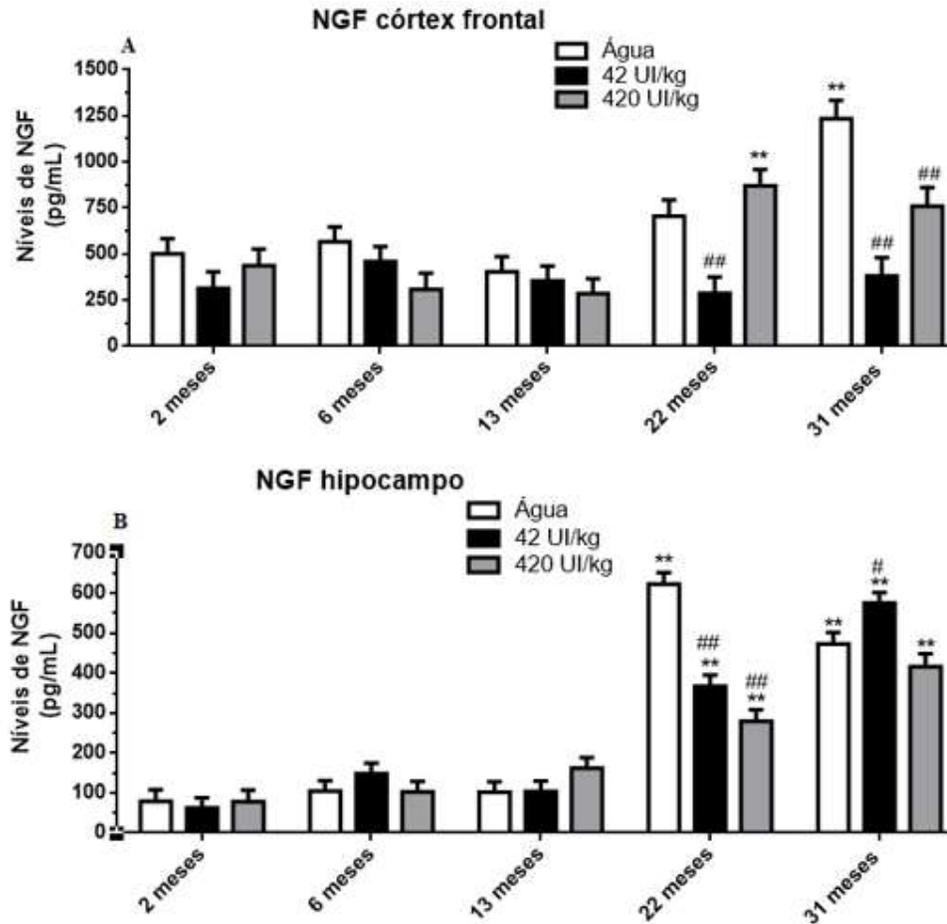


**Figura 14 A e B:** Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) durante 21 dias nos níveis de BDNF em estruturas cerebrais do córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistars. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM com 3-6 animais por grupo, #p<0,05, ##p<0,01 quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e \*p<0,05, \*\*p<0,01 quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

Os níveis de NGF estão apresentados na figura 15 (A e B). Foram observadas diferenças estatísticas no córtex frontal [ $F(1,14) = 8,10$ ;  $p < 0,001$ ] e no hipocampo [ $F(1,14) = 50,06$ ;  $p < 0,01$ ].

No córtex frontal (figura 15 A), as idades de 22 e 31 meses, apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Na idade de 22 meses houve uma redução dos níveis de NGF, no grupo vitamina D3 42 UI/kg, quando comparado ao controle (água) de 22 meses. A dose de 420 UI/kg mostrou aumento dos níveis de NGF quando comparado ao controle 2 meses. Já, na idade de 31 meses, as doses de 42 ( $p < 0,001$ ) e 420 UI/kg ( $p < 0,001$ ), foram capazes de reverter o aumento do NGF observado no grupo controle (água) desta idade quando comparado ao controle (água) de 2 meses. Os animais com 2, 6 e 13 meses não apresentaram resultados estatísticos entre os grupos quando comparados dentro da mesma idade.

No hipocampo (figura 15 B), se repete um padrão semelhante ao córtex frontal. As idades de 22 e 31 meses apresentam diferenças estatísticas. Já, as idades de 2, 6 e 13 meses, permaneceram sem apresentar alterações mediante aos tratamentos quando comparados ao grupo controle (água) dentro da mesma idade. Na idade de 22 meses houve aumento dos níveis de NGF no grupo controle (água), quando comparado ao controle (água) de 2 meses, que foi revertido com as doses de 42 UI/kg ( $p < 0,001$ ) e 420 UI/kg ( $p < 0,001$ ). Os animais de 31 meses apresentaram aumento nos níveis de NGF no grupo controle (água) quando comparado ao controle (água) de 2 meses, e a vitamina D3 na dose de 42 UI/kg ( $p < 0,01$ ), aumentou estes níveis quando comparado ao controle (água) dentro dessa idade. A dose de 420 UI/kg, não demonstrou diferenças estatísticas.



**Figura 15 A e B:** Efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) durante 21 dias nos níveis de NGF em estruturas cerebrais do córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratos Wistars nas idades de 2, 6, 13, 22 e 31 meses. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM com 3-6 animais por grupo, <sup>#</sup>p<0,05, <sup>##</sup>p<0,01 quando comparado ao grupo controle dentro da mesma idade e \*p<0,05, \*\*p<0,01 quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses.

A tabela 1 apresenta, de forma resumida, o efeito do tratamento com vitamina D3 (42 e 420 UI/kg) durante 21 dias nas memórias de habituação e espacial, bem como nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, BDNF e NGF em estruturas cerebrais do córtex frontal e hipocampo de ratos *Wistars* nas idades de 2, 6, 13, 22 e 31 meses.

Idade(meses) e tratamento	M. espacial		M. de habituação	[ ] Vit D3 no Soro	TNF- $\alpha$		IL-1 $\beta$		IL-6		IL-10		BDNF		NGF	
	L.Y	L.O			CF	HIP	CF	HIP	CF	HIP	CF	HIP	CF	HIP	CF	HIP
2 meses – ÁGUA	☺	☺	☺	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 meses – 42UI/kg	☀	☀	☀	—	—	—	—	—	—	—	—	☀	—	—	—	—
2 meses – 420UI/kg	☀	☀	☀	↑☀	—	—	↑☀	↑☀	—	—	—	↑☀	—	—	—	—
6 meses – ÁGUA	☹	☹	☺	—	—	—	↑	—	—	—	—	—	↓	—	—	—
6 meses – 42UI/kg	☹	☀	☀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	↑☀	—	—	—
6 meses – 420UI/kg	☹	☀	☀	↑☀	—	—	↓☀	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13 meses – ÁGUA	☹	☹	☹	—	↑	↑	↑	—	—	—	↑	—	—	—	—	—
13 meses – 42UI/kg	☹	☀	☀	↑☀	↓☀	↓☀	↓☀	—	—	—	↓☀	—	—	—	—	—
13 meses – 420UI/kg	☹	☀	☹	↑☀	↓☀	—	↓☀	—	—	—	↓☀	—	—	—	—	—
22 meses – ÁGUA	☹	☹	☹	—	↑	—	—	—	↑	↑	↑	↑	—	—	↑	↑
22 meses – 42UI/kg	☹	☀	☀	—	—	—	—	—	↓☀	↑☀	↓☀	↑☀	—	—	↓☀	↓☀
22 meses – 420UI/kg	☀	☀	☹	↑☀	↑☀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	↓☀
31 meses – ÁGUA	X	☹	☹	—	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	—	↑	—	↑	↑
31 meses – 42UI/kg	X	☹	☹	—	—	—	↓☀	↓☀	↓☀	—	↓☀	—	↓☀	—	↓☀	↑☀
31 meses – 420UI/kg	X	☀	☹	—	—	—	↓☀	↑☀	—	↓☀	↓☀	—	↓☀	—	↓☀	—

**Tabela1:** ☺= usado quando o controle (água) não apresenta dano de memória; ☀= representa as doses de vitamina D de 42 e 420 UI/kg com  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo água dentro da mesma idade; ☹= indica dano de memória; ↑= indica níveis aumentados de citocinas ou neurotrofinas quando comparado ao grupo controle (água) dos animais de 2 meses; ↓= indica níveis diminuídos de citocinas ou neurotrofinas quando comparados ao grupo controle (água) dos animais de 2 meses; ↑☀= indica níveis aumentados de citocinas ou neurotrofinas quando comparados ao grupo controle (água) dentro da mesma idade; ↓☀= indica níveis diminuídos de citocinas ou neurotrofinas quando comparados ao grupo controle (água) dentro da mesma idade. **M. espacial**= memória espacial; **M. de habituação**= memória de habituação; **L.Y**= Labirinto em Y; **L.O**= Labirinto Octogonal; **CF**= córtex frontal; **HIP**= hipocampo e **X**= grupos que não passaram pelo teste do labirinto em Y; [ ] Vit D3= Concentração de vitamina D3 no soro dos animais suplementados quando comparados ao controle (água) dentro da mesma idade.

## 5 Discussão

No presente estudo, foram examinados os efeitos da vitamina D3 em processos de memória, como a memória de habituação ao campo aberto e a memória espacial em ratos *Wistar* machos com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade. Para tanto, foram utilizados os testes de habituação ao campo aberto, do labirinto em Y e do labirinto octogonal. Os testes do labirinto octogonal e de habituação ao campo aberto foram realizados nas idades de 2, 6, 13, 22 e 31 meses, porém, não foi possível realizar o teste do labirinto em Y na idade de 31 meses mediante a alta taxa de mortalidade nesta idade. Em roedores já foi relatado que durante o envelhecimento natural ocorre declínio da memória de habituação (Deacon, Koros et al. 2009) e das funções espaciais devido às alterações fisiológicas que ocorrem com o envelhecimento em diferentes regiões do cérebro, principalmente no hipocampo (Mora-Gallegos, Rojas-Carvajal et al. 2015).

Durante o envelhecimento, o número de células nervosas cerebrais é notavelmente reduzido, bem como as alterações no fluxo sanguíneo cerebral que estão associados ao aumento do risco de déficit cognitivo (Cesari, Vellas et al. 2013, Bartsch and Wulff 2015, Zlatar, Bischoff-Grethe et al. 2016). Essas alterações acabam ocasionando a disfunção de memória, principalmente a memória recente (Izquierdo, Barros et al. 1998). Com o envelhecimento ocorre também o aumento da incidência de algumas doenças, principalmente das doenças neurodegenerativas, entre elas, a de maior incidência, é a doença de Alzheimer (Ismail, Nguyen et al. 2011). As alterações na cognição que ocorrem com o processo de envelhecimento normal estão relacionadas com a redução na eficiência 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 (Yu, Oh et al. 2016).

A localização regional e celular do receptor de vitamina D é notavelmente semelhante no cérebro de humanos e de ratos (Veenstra, Prufer et al. 1998, Prufer, Veenstra et al. 1999, Eyles, Smith et al. 2005). Portanto, é importante ressaltar que a utilização do modelo animal em ratos para avaliar o efeito da vitamina D é, até então, a ferramenta mais adequada (O'Loan, Eyles et al. 2007, Turner, Young et al. 2013). Como os seres humanos, os animais de laboratório apresentam déficit em sua capacidade de aprender e recordar à medida que envelhecem. Em ratos de laboratório, déficits cognitivos

relacionados à idade têm sido observados em tarefas que utilizam a memória espacial, como o labirinto octogonal, labirinto circular de Barnes e o labirinto aquático de Morris (Packard and White 1991, Deacon, Koros et al. 2009, Briones and Darwish 2012, Latimer, Brewer et al. 2014, Alrefaie and Alhayani 2015, Al-Harbi, Khan et al. 2017, Medeiros, de Carvalho Myskiw et al. 2018). No entanto, atualmente, não há tratamentos para esses déficits cognitivos, pois sua causa subjacente não é bem compreendida.

Para avaliar a memória espacial no presente trabalho, foram utilizados os testes do labirinto em Y e do labirinto octogonal com a presença de orientação espacial para o animal completar a tarefa (Dellu, Fauchey et al. 1997, Lee, Kho et al. 2014). O teste comportamental do labirinto em Y, é um teste de reconhecimento para avaliar a memória espacial. Nesta tarefa, durante a primeira sessão, o animal pode explorar apenas dois braços o de “partida” e o “outro” do labirinto, com o terceiro braço “novo” bloqueado com uma porta guilhotina. Durante a sessão teste, a porta guilhotina é aberta e todos os três braços estão acessíveis. A discriminação da novidade *versus* familiaridade pode ser analisada comparando a exploração dos animais nos braços “novo e outro”. Uma vez que a tarefa se baseia na tendência natural dos roedores para explorar a novidade, a preferência pela novidade e a memória podem ser avaliadas pelo tempo de permanência entre esses dois braços durante a sessão de teste (Conrad, Lupien et al. 1997, Dellu, Contarino et al. 2000, Martin, Jones et al. 2003). Já o teste comportamental do labirinto octogonal ocorreu durante 5 dias, sendo o primeiro contado como treino e os 4 seguintes como teste. Neste teste, o animal precisa consolidar, armazenar e recordar em qual braço estava a recompensa, além de não retornar onde já consumiu a mesma (Foyet, Hritcu et al. 2011, Hritcu, Cioanca et al. 2012, Lee, Kho et al. 2014).

O teste do labirinto em Y foi realizado com os animais de 2, 6, 13 e 22 meses de idade, enquanto que o labirinto octogonal foi realizado entre todas as idades, incluindo a de 31 meses. É importante salientar que o presente trabalho é o primeiro a avaliar o efeito da vitamina D3 em um modelo animal de envelhecimento natural com as idades de 13, 22 e 31 meses, bem como avaliar o efeito das duas doses em animais mais jovens (2 e 6 meses). Até o presente momento, não estão disponíveis na literatura, trabalhos que abordem a mesma via de administração, dosagem, curva de idade e testes comportamentais executados no presente estudo.

Os animais com idade de 2 meses não apresentaram dano de memória espacial no teste do labirinto em Y, onde todos os animais se mantiveram por maior tempo explorando o “braço novo” quando comparado ao “outro braço” do aparato durante o teste, demonstrando que a vitamina D3 apresentou o mesmo efeito que nos animais controle. O mesmo foi observado no labirinto octogonal, quando avaliado o tempo para encontrar a recompensa ao longo dos 4 dias de teste, porém, quando avaliado o número total de erros, o grupo suplementado com a dose de vitamina D 3 de 42 UI/kg diminuiu o número de erros apenas no 4º dia e, com a dose de 420 UI/kg, diminuiu os erros no 3º e 4º dias, sendo que o grupo controle (água) diminuiu os erros nos três dias de teste (2º, 3º e 4º ). Isso pode indicar que a vitamina D em animais saudáveis e jovens pode acarretar algum dano. Contudo adicionais estudos precisam ser realizados para afirmar esta hipótese.

No labirinto em Y, na idade de 6 meses, nenhum dos grupos apresentou diferenças estatísticas quando comparado o tempo de exploração entre os braços “outro e novo”, caracterizando um dano de memória espacial nesses animais que não foi prevenido pela vitamina D3. Entretanto, no labirinto octogonal, os mesmos animais, suplementados com a vitamina D3, reduziram o tempo e o número de erros no último dia de teste (4º dia) para encontrar a recompensa em ambas as doses (42 e 420UI/kg), demonstrando que a vitamina D3 foi capaz de melhorar a memória espacial nesses animais.

Os animais com 13 e 22 meses de idade apresentaram dano de memória espacial nos grupos controles (água) em ambos os testes. No labirinto em Y a vitamina D3, na dose de 420 UI/kg, foi capaz de prevenir o dano, porém, a dose mais baixa de 42 UI/kg não foi capaz de prevenir este dano causado pelo envelhecimento. No labirinto octogonal, ambas as doses de vitamina D3 foram capazes de melhorar o desempenho desses animais diminuindo o tempo e os erros para encontrarem a recompensa. Os diferentes resultados apresentados na dose de 42 UI/kg na memória espacial entre o labirinto em Y e o octogonal, podem estar relacionados ao fato de que no labirinto octogonal, os animais são submetidos a um maior período de treino e teste, somando um total de 5 dias, proporcionando maior tempo para consolidação da memória de longo prazo. Também, recebem um estímulo por meio da recompensa colocada nos braços onde se encontram as pistas geométricas e, ainda, passam por uma restrição alimentar, o que aguça ainda mais a procura pela recompensa durante o teste (Packard and White 1991).

Já no labirinto em Y, os animais dispõem apenas de 2 horas de intervalo entre o treino e o teste o que envolve uma memória mais recente, não recebem estímulos compensatórios, apenas dispõem de pistas geométricas nos três braços para os auxiliar na localização espacial (Deacon and Rawlins 2006). Portanto, a memória avaliada no labirinto octogonal parece ser mais robusta que àquela avaliada no labirinto em Y.

Um estudo com ratos machos do tipo transgênico F344, uma linhagem de ratos que apresentam envelhecimento acelerado, com idade de 6 e 20 meses, suplementados com vitamina D3 durante 21 dias, por injeção via intraperitoneal (IP) na dose de 42 UI/kg, demonstrou efeito significativo nos ratos com 20 meses de idade avaliados no labirinto aquático de Morris. Este consiste em treinar os animais para encontrar uma plataforma submersa em uma piscina com água. Os mesmos diminuíram a latência média da natação em comparação ao grupo controle (salina), sugerindo então que o comprometimento cognitivo relacionado com a idade é diminuído pela suplementação com vitamina D3 (Briones and Darwish 2012). Esses dados corroboram os resultados do presente estudo quando avaliada a memória espacial através no labirinto octogonal, uma vez que as doses de 42 e 420 UI/kg, nas idades de 6, 13 e 22 meses, e a dose de 420 UI/kg, na idade 31 meses, foram capazes de prevenir o dano de memória desses animais causados pelo envelhecimento.

Os animais com 31 meses de idade, foram submetidos apenas ao labirinto octogonal devido ao número reduzido de animais, e a preocupação em não os sobrecarregar com muitos comportamentos em uma única vez. Estes mostraram dano de memória espacial que foi revertido apenas na dose de 420 UI/kg quando avaliado o tempo para encontrar a recompensa. Porém, isso não ocorreu com o número total de erros. E, o mesmo ocorreu no labirinto em Y, nas idades de 13 e 22 meses, em que a vitamina D3 na dose de 42 UI/kg, não demonstrou efeito preventivo ao contrário do que foi demonstrado no estudo de Briones e Darwish (2012), através do labirinto aquático de Morris em animais que receberam a vitamina D3 por via IP. A possível explicação para tal diferença pode ser atribuída ao fato de que se tratam de testes distintos e com idades e sensibilidade singulares e, também, pode ser que a diferença esteja no metabolismo de primeira passagem da vitamina D3 por administração oral, o que pouco ocorreu quando administrada por via IP. Neste sentido, doses menores podem apresentar melhor efeito por via IP e, em maiores doses, podem apresentar efeito semelhante quando administradas

por via oral. Contudo, no presente estudo, a ação protetora da vitamina D3 contra os danos de memória espacial causados pelo envelhecimento natural, também foi observada.

Outro estudo realizado em 2014, com ratos machos F344 com idade entre 11 a 13 meses, consistiu na suplementação através de dietas contendo baixo (100 UI), médio (1.000 UI) ou alto (10.000 UI) nível de vitamina D3 por um período de 5 a 6 meses. Seus resultados mostram que os grupos que receberam dieta com baixo e médio nível de vitamina D3, revelaram déficits de memória espacial através do labirinto aquático de Morris, apresentando dificuldades para encontrar a plataforma, parecendo perdidos ou confusos durante a busca, não revertendo os danos causados pelo envelhecimento nas suplementações com 100 e 1.000 UI. O grupo suplementado com alto nível de vitamina D3, por outro lado, realizou esta tarefa extremamente bem, atingindo o objetivo com metade do tempo e da distância em comparação com os outros dois grupos (Latimer, Brewer et al. 2014). Um outro estudo realizado com SAMP8 (camundongo propenso à senescência acelerada 8) com 10 semanas de idade, um modelo adequado e reconhecido de doença de Alzheimer relacionada à idade, utilizou o labirinto aquático de Morris para avaliar a memória desses animais. Os mesmos receberam tratamento isolado com vitamina D3 na dose de 500 UI/kg por via intramuscular e ou em conjunto com a suplementação de resveratrol 43 mg/kg/d, através de dieta, durante 24 semanas. Os resultados sugerem que a suplementação de vitamina D3 e resveratrol poderia reverter o comprometimento cognitivo em 34 semanas de idade de camundongos SAMP8. A suplementação combinada de vitamina D3 com resveratrol foi mais eficaz do que a intervenção isolada (Cheng, Rui et al. 2017). Estes dados corroboram os resultados apresentados no presente trabalho, sobre o papel protetor promissor que a vitamina D3 pode exercer em relação aos danos de memória espacial ocasionados pelo envelhecimento.

Além disso, foi avaliada a memória de habituação ao campo aberto de animais suplementados com vitamina D3. Para avaliar a memória de habituação foi realizado o teste de habituação ao campo aberto em animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade. Este teste comportamental tem como objetivo avaliar a memória de habituação por meio de parâmetros, tais como, levantamentos e os cruzamentos, que o animal realiza durante a exploração do aparato (Vianna, Alonso et al. 2000). No presente estudo os animais com 2 e 6 meses de idade, diminuíram o número de cruzamentos e de levantamentos quando

comparados o dia do treino com o dia do teste, dentro de cada grupo. Isso demonstra que todos os grupos aprenderam. Os animais com idade de 13 meses apresentaram dano de memória quando avaliado o número de cruzamentos. Este dano foi prevenido com a dose 42 UI/kg. No entanto, a dose maior de 420 UI/kg não apresentou o mesmo desempenho. Quando avaliado o número de levantamentos, ainda nesta idade de 13 meses, foi observado que o grupo controle (água) assim como o grupo suplementado com 42 UI/kg de vitamina D3, diminuíram o número de levantamentos quando comparados o treino com o teste, dentro do mesmo grupo, e a dose maior de 420 UI/kg, assim como no número de cruzamentos, não apresentou efeito preventivo contra este dano.

Os animais com 22 meses apresentam dano de memória no grupo controle, tanto no número de cruzamentos, quanto no de levantamentos e, ambos os danos, foram prevenidos somente na dose de 42 UI/kg. Por fim, os animais com idade de 31 meses apresentaram danos de memória de habituação que não foi prevenido por nenhuma das doses de vitamina D3. A memória de habituação é classificada como uma memória não associativa de longo prazo. As memórias de longo prazo podem ser divididas em associativas e não associativas, dependendo dos mecanismos necessários para sua formação. As memórias associativas são baseadas na aquisição de uma ligação preditiva entre um evento específico e um estímulo. As memórias não associativas são adquiridas quando a exposição repetida ou contínua a um novo estímulo altera as respostas comportamentais a ele. Em mamíferos, algumas formas de memórias associativas e não-associativas envolvem a participação da formação hipocampal (Izquierdo and Medina 1997, Zhu, McCabe et al. 1997, Thiel, Huston et al. 1998). No presente estudo foi possível verificar que a vitamina D3 pôde prevenir os danos de memória de habituação nas idades de 6, 13 e 22 meses. Portanto, baseado nestes dados, pode-se especular a importância da vitamina D3 para a aquisição e a consolidação da memória não associativa de habituação.

Ao longo das próximas décadas, tendo em conta a expectativa de vida crescente da população idosa, a incidência do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade deverá aumentar drasticamente. Um fator importante que desempenha um papel crucial no envelhecimento cerebral é a demanda alta de energia dos neurônios para preservar processos neuronais e manter a capacidade cognitiva. Um dos mais reconhecidos efeitos do envelhecimento cerebral é a desregulação do sistema imunológico como resultado da produção não controlada de espécies reativas

de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias (Esiri 2007, Davinelli, Maes et al. 2016). Nos últimos anos, a inflamação tem sido uma área-chave de interesse em pesquisas relacionadas com a idade. Com o avanço da idade, o organismo desenvolve um processo conhecido como "inflamação crônica de baixo grau" ou *inflammaging*. Isto refere-se a imunossenescência, que inclui alterações normais resultantes do envelhecimento do sistema imunológico (Gruver, Hudson et al. 2007, Watson, Ding et al. 2017).

Afim de investigar a ação imunoprotetora e imunomodeladora da vitamina D3, foram realizados, no presente estudo, testes de imunoenensaio enzimático para verificar os níveis das citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10. O presente estudo mostrou que as duas doses de vitamina D3 apresentaram ação modulatória na idade de 13 meses, diminuindo os níveis das citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, no córtex frontal, com as doses de 42 e 420 UI/kg, sendo que, no hipocampo, apenas os níveis de TNF $\alpha$  foram reduzidos com a dose de 42 UI/kg. As citocinas pró-inflamatórias, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , aparecem em nível elevado na idade de 13 meses, o que pode explicar a redução de ambas juntamente com a citocina anti-inflamatória IL-10 nos grupos suplementados com vitamina D3. Isso indica que pode estar havendo uma ação imunomoduladora desencadeada pela vitamina D3 junto a inflamação ocasionada pelo envelhecimento, pois embora a vitamina D3 seja mais conhecida como um modulador da homeostase do Ca<sup>2+</sup>, ela também possui um potencial modulador imunológico (Correale, Ysraelit et al. 2009).

Na idade de 22 meses a vitamina D3 elevou os níveis de TNF $\alpha$  na dose de 420 UI/kg quando comparado com o grupo controle (água) dentro da mesma idade, no córtex frontal. Ainda no córtex frontal, nos animais de 22 meses, os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 e da anti-inflamatória IL-10, foram diminuídos na dose de 42 UI/kg e, a mesma dose, foi capaz de elevar os níveis dessas citocinas no hipocampo quando comparados ao controle (água) dentro da mesma idade. Os animais controles (água) de 31 meses apresentaram aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-10 no córtex e no hipocampo, quando comparados ao controle (água) de 2 meses. Esse aumento foi revertido por ambas as doses de vitamina D3 no córtex frontal. Já no hipocampo, a dose de 42 UI/kg, reduziu o nível de IL-1 $\beta$  e a dose de 420 UI/kg proporcionou o aumento dessa citocina pró-inflamatória. A IL-6 apresentou nível elevado no controle dos animais de 31 meses em ambas as estruturas, quando comparado ao grupo controle (água) de 2 meses, e a dose de 42 UI/kg, diminuiu esses níveis no córtex frontal, enquanto a dose de 420 UI/kg reduziu

os níveis no hipocampo. A dose de 420 UI/kg aumentou os níveis de IL-1 $\beta$  no córtex frontal e no hipocampo dos animais com 2 meses de idade. Os animais com 6 meses tiveram os níveis de IL-1 $\beta$  reduzidos no grupo suplementado com a dose de 420 UI/kg quando comparado ao grupo controle (água) dentro da mesma idade. Em um estudo com ratos F344 com idade de 6 e 20 meses, a suplementação com vitamina D3, por injeção via IP na dose de 42 UI/kg, foi capaz de modular o aumento do estado pró-inflamatório, diminuindo os níveis de IL-1 $\beta$ , relacionada à idade e à carga amiloide, sugerindo que esses efeitos da vitamina D3, pode ter mediado a diminuição do comprometimento da memória observada nos ratos idosos (Briones and Darwish 2012). Estes resultados corroboram os dados do presente estudo que sugerem que a vitamina D3 teve uma ação modulatória na regulação dos mediadores pró e anti-inflamatórios.

Um estudo que investigou os efeitos da vitamina D3 sobre o nível de expressão de IL-6 e IL-17A em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com EM, após o tratamento com vitamina D3 (50.000 UI por v.o) uma vez por semana durante 8 semanas. Este estudo mostrou que a expressão de IL-6 aumenta após dano axonal, especialmente em neurônios, e sua regulação positiva é mostrada na neuroinflamação do SNC o que induziu a proliferação de células T, que induzem a produção de IL-10 e sua infiltração no SNC. A regulação positiva da expressão gênica de IL-6 e IL-17A foi mostrada sob tratamento com vitamina D3 neste trabalho (Naghavi Gargari, Behmanesh et al. 2015). No presente estudo a dose mais baixa de 42 UI/kg demonstrou ser capaz de regular a expressão tanto da citocina pró-inflamatória, IL-6, quanto da anti-inflamatória, IL-10, ocasionando o aumento dessas citocinas no hipocampo dos animais com 22 meses. Isso pode ser explicado, como em uma tentativa de diminuir e estabilizar o estado inflamatório presente nessa região em decorrência do envelhecimento natural, apresentando um bom efeito também na memória espacial e de habituação ao campo aberto.

A dose de 420 UI/kg teve um bom efeito na memória espacial e também reduziu alguns marcadores inflamatórios, porém, foi observado um resultado não esperado quando avaliadas as citocinas IL-1 $\beta$  na idade de 22 meses e TNF- $\alpha$  na idade de 31 meses, as quais apresentaram um aumento significativo com essa dose. Uma resposta semelhante já foi encontrada em outro estudo, onde Vilela et al. (2017), observou o aumento de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em animais de 24 meses submetidos ao treinamento de força

e, também, foi observado a melhora da memória espacial no labirinto de Barnes. Neste caso, os autores sugerem que o aumento dessas citocinas inflamatórias podem estar relacionadas com a melhora da memória (Vilela, Muller et al. 2017), já que essas possuem um papel ativo no desenvolvimento neuronal e na neuroplasticidade (Tonelli and Postolache 2005, Khairova, Machado-Vieira et al. 2009), principalmente se for considerado que no envelhecimento há uma inflamação de baixo grau (Gruver, Hudson et al. 2007, Watson, Ding et al. 2017).

Uma pesquisa clínica com 132 pacientes hispânicos com EM clinicamente definida, sendo desses 58 com EM remittente recidivante durante a remissão, 34 durante a recaída, 40 casos de EM progressiva primária e, mais 60 indivíduos saudáveis foram selecionados como controles, pareados em relação ao local de residência, raça/etnia, idade e sexo. Este estudo mostrou que a vitamina D3 causou o aumento do número de células T produtoras de IL-10, a diminuição do número de células produtoras de IL-6 e IL-17 e inibiu a produção de IL-17 nesses pacientes, incluindo os controles saudáveis (Correale, Ysrraelit et al. 2009). Um estudo clínico, onde foram incluídos 46 pacientes adultos com pneumonia associada à ventilação (PAV) e com deficiência de vitamina D, os pacientes foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo de pacientes recebeu injeção intramuscular única de vitamina D3 (300000 UI), enquanto o outro grupo recebeu o placebo. A administração de vitamina D3 aumentou significativamente os níveis séricos da vitamina D nos pacientes tratados quando comparados ao grupo placebo e, também, reduziu significativamente os níveis séricos de IL-6 no grupo tratado com a vitamina D3. Curiosamente, a taxa de mortalidade dos pacientes tratados com vitamina D3 (5/24) foi significativamente menor ( $p = 0,04$ ) do que no grupo placebo (11/22). Isso indica que a administração de vitamina D3 deve ser considerada como opção adjuvante no tratamento de pacientes com PAV (Miroliaee, Salamzadeh et al. 2018). Adicionalmente, um estudo *in vitro* mostrou que a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e NO (óxido nítrico) é inibida na linhagem celular microglial 13 (EOC13) pela administração de vitamina D, indicando um papel anti-inflamatório direto de 1, 25 (OH) $_2$  D $_3$  nas células da micróglia (Slominski, Kim et al. 2014). Todos estes achados corroboram os resultados encontrados no presente estudo, demonstrando que a vitamina D pode exercer uma ação imunomoduladora no envelhecimento.

Na literatura já está bem descrito que o envelhecimento exacerba a neuroinflamação e os déficits neurocomportamentais quando o sistema imune inato periférico é ativado. Uma infecção periférica pode ativar o sistema imune inato, que retransmite o sinal inflamatório pelas vias neural e humoral da periferia para o cérebro, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , pelas células gliais (Gruver, Hudson et al. 2007, Hubackova, Krejcikova et al. 2012, Annweiler, Montero-Odasso et al. 2013, Heidary, Rakhshi et al. 2014, Bartsch and Wulff 2015). No cérebro, a micróglia responde ao estímulo produzindo citocinas inflamatórias, que são parcialmente responsáveis pelo processo fisiopatológico inflamatório nas doenças. Entretanto, o envelhecimento fisiológico normal parece "preparar" a micróglia e preparar o cenário para uma resposta exagerada quando o sistema imunológico inato está ativado. A exacerbação da resposta das citocinas no cérebro nos idosos pode resultar em doença prolongada, comprometimento cognitivo, depressão, e potencialmente, o início de doença neurológica (Godbout, Chen et al. 2005, Annweiler, Montero-Odasso et al. 2013, Taylor, Main et al. 2013). Esses achados vão de encontro com os resultados apresentados no presente estudo, onde os animais com idade avançada demonstram um estado inflamatório aumentado e, na maior parte deles, a suplementação de vitamina D3 foi capaz de modular os níveis das citocinas inflamatórias e prevenir danos de memória espacial e de habituação.

A maioria dos indivíduos idosos mostra uma diminuição gradual das capacidades cognitivas que estão associadas às alterações corticais ou do hipocampo, regiões do cérebro envolvidas em processos de memória e aprendizagem (Tapiá-Arancibia, Aliaga et al. 2008). Os fatores neurotróficos apresentam ligação direta com o comprometimento cognitivo em cérebros envelhecidos (Burke and Barnes 2006). O desenvolvimento fenotípico e manutenção de populações de células específicas em desenvolvimento no SNC, dependem dos fatores neurotróficos que são peptídeos secretados com a função de crescimento e desenvolvimento (Siegel and Chauhan 2000). No presente estudo foram mensurados os níveis dos fatores neurotróficos BDNF e NGF no córtex frontal e no hipocampo dos animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses de idade.

No córtex frontal o BDNF mostrou nível aumentado no controle (água) de 31 meses quando comparado ao controle (água) de 2 meses e, as doses de vitamina D3 de 42 e 420 UI/kg, foram capazes de reverter esse aumento. Já no hipocampo, a dose de 42

UI/kg foi capaz de aumentar os níveis de BDNF nos animais com 6 meses de idade. Os níveis de NGF estavam aumentados no córtex frontal dos animais com 22 e 31 meses e a dose de 42 UI/kg de vitamina D3 foi capaz de reverter esse aumento. Porém, a dose maior, de 420 UI/kg, apenas reverteu o aumento de NGF na idade de 31 meses. No hipocampo, as idades de 22 e 31 meses, apresentaram níveis aumentados de NGF nos animais controles (água) de ambas as idades quando comparados ao controle (água) de 2 meses. As duas doses de vitamina D3 foram capazes de reverter esse aumento na idade de 22 meses. No entanto, na idade de 31 meses a dose de 420 UI/kg elevou os níveis dessa neurotrofina.

O BDNF promove a sobrevivência e diferenciação de neurônios, protege contra a neurodegeneração, danos neuronais e inibe o declínio da memória e cognição relacionados à idade (Li, Xu et al. 2016). Um estudo clínico, envolvendo adultos entre 20 e 93 anos, mostrou que no envelhecimento, o polimorfismo genético do BDNF (val66met) pode afetar a memória episódica em idosos (Kennedy, Reese et al. 2015). Além disso, foi observado que o BDNF pode ser um indicativo da função cognitiva em mulheres idosas (Komulainen, Pedersen et al. 2008). Outro estudo pré-clínico realizado com camundongos BDNF<sup>+/+</sup> (deleção heterozigótica do gene do BDNF) com idade entre 3 e 9 meses, mostrou que a deficiência de BDNF induziu dano na memória dos animais mais velhos com idade de 9 meses, verificado através do labirinto aquático de Morris. Curiosamente, esse declínio dependente da idade na aprendizagem espacial em camundongos BDNF<sup>+/+</sup> não foi acompanhado por um declínio dos níveis de proteínas do BDNF com a idade. No entanto, quando comparados, independentemente da idade, os níveis de BDNF de animais que aprenderam a tarefa com sucesso, foi observado uma correlação positiva entre a concentração de BDNF no hipocampo e o desempenho no teste do labirinto aquático de Morris, enfatizando ainda mais a importância do BDNF no hipocampo para a aprendizagem espacial (Petzold, Psotta et al. 2015).

Esses dados corroboram os resultados do presente estudo, em que mostrou níveis elevados de BDNF nos animais mais velhos com 31 meses de idade, e as doses de 42 e 420 UI/kg de vitamina D3, foram capazes de reverter esse aumento no córtex frontal. Porém isso não ocorreu no hipocampo, e a dose de 420 UI/kg, foi capaz de prevenir o dano de memória espacial, observado no teste de labirinto octogonal, quando avaliado o tempo total para encontrar a recompensa desses animais comparados ao grupo controle

(água) dentro da mesma idade. Este aumento do BDNF pode também estar relacionado a sua forma imatura, o pró-BDNF que, por sua vez, está relacionado à apoptose celular. Quando o pró-BDNF se liga ao receptor p75NTR, ativa as vias apoptóticas nos neurônios periféricos e na glia (Teng, Teng et al. 2005, Budni, Bellettini-Santos et al. 2015). Em estudo pré-clínico, realizado com ratos machos e fêmeas de diferentes idades 2 a 4 meses (adultos), 10 meses (meia idade) e 22 e 24 meses (idosos), mostrou que os receptores de BDNF, mais do que o próprio BDNF, podem ser os desencadeadores de alterações neuroendócrinas associadas com o envelhecimento (Rage, Silhol et al. 2007). No presente estudo, foi quantificado o valor do BDNF total, não sendo possível quantificar, separadamente, o BDNF maduro da sua forma imatura, o pró-BDNF, através do Kit utilizado.

Fatores de crescimento como o NGF são importantes na plasticidade neuronal e na sobrevivência dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo (córtex cerebral, hipocampo, prosencéfalo basal e hipotálamo), que são relacionados à memória (Korsching, Auburger et al. 1985). Em estudo realizado com ratos Fischer 344 idosos (28 meses) e adultos (6 meses), foi demonstrado que os níveis de NGF estavam reduzidos no hipocampo dos animais com 28 meses de idade (Larkfors, Ebendal et al. 1987). Outro estudo pré-clínico, realizado com ratos *Wistar* com 24 meses de idade, mostrou que os níveis de NGF estavam diminuídos no córtex desses animais (Perovic, Tesic et al. 2013). A administração de  $\beta$ -amilóide (25-35) intracerebroventricular por 14 dias, em ratos machos adultos, induziu a redução da expressão da proteína NGF nesse modelo animal da doença de Alzheimer (Ji, Song et al. 2011). Os resultados do presente estudo, ao contrário dos achados em estudos anteriormente citados, apresentaram níveis elevados de NGF nos animais controles (água) de 22 e 31 meses de idade quando comparados ao controle (água) de 2 meses, tanto no córtex quanto no hipocampo. Tais níveis foram modulados pela ação da vitamina D3 na dose de 42 UI/kg em ambas as idades no córtex frontal. Já a dose maior (420 UI/kg), apenas reduziu os níveis na idade de 31 meses. No hipocampo a vitamina D3 reverteu os níveis de NGF nas duas doses nos animais de 22 meses, porém, na idade de 31 meses, foi observado que a dose de 420 UI/kg elevou ainda mais os níveis dessa citocina.

O aumento do NGF pode estar relacionado também a sua forma imatura, o pró-NGF. O pró-NGF, a forma precursora não clivada do NGF, liga-se ao receptor

p75NTR com maior afinidade (Lee, Kermani et al. 2001). Notavelmente, o receptor p75NTR é bem conhecido por seu papel em mediar a morte celular neuronal (Underwood and Coulson 2008). Existem evidências crescentes de que o pró-NGF forma um complexo heterotrimérico com o receptor p75NTR e o receptor de neurotensina e sortilina, para ativar cascatas apoptóticas (Nykjaer, Lee et al. 2004, Al-Shawi, Hafner et al. 2008). A secreção de NGF pode ser uma mistura de pró-NGF e de NGF maduro. O pró-NGF é a forma predominante de NGF no SNC (Esposito, Patel et al. 2001, Fahnstock, Michalski et al. 2001, Budni, Bellettini-Santos et al. 2015, Triaca, Sposato et al. 2016). Dessa forma, pode ser que o pró-NGF esteja aumentado e não, necessariamente, o NGF, pois os anticorpos para NGF, assim como BDNF, não distinguem entre os pró-NGF e BDNF de suas formas maduras: NGF e BDNF.

Para determinar as alterações relacionadas com a vitamina D referentes à idade, foram avaliados, no presente estudo, os níveis circulantes da forma ativa da vitamina D3 (1,  $\alpha$ 25-dihidroxitamina D3) no soro dos animais com 2, 6, 13, 22 e 31 meses, tanto animais suplementados, como os grupos controles. De acordo com os dados do presente estudo, houve uma menor absorção de vitamina D3 na dose de 42 UI/kg nas idades de 2, 6, 22 e 31 meses. Sendo que na idade de 31 meses não houve aumento dos níveis de vitamina D3 em nenhum dos três grupos. A idade pode ser um fator importante para explicar o efeito da vitamina D3 na memória de habituação ao campo aberto na idade de 31 meses, pois pode interferir na absorção de vitaminas. Contudo não explica tudo, pois na memória espacial teve um bom efeito. A porcentagem de absorção de vitamina D3 em humanos com mais de 60 anos é menor quando há um alto teor de gordura corporal (Dawson-Hughes, Harris et al. 2013), o mesmo pode ter ocorrido com esses animais no presente estudo, onde a absorção de vitamina D3 pode ter sido prejudicada por seu peso e teor de gordura corporal, em animais envelhecidos. No entanto, a dose maior (420 UI/kg) também poderia ser afetada, o que não ocorreu. Talvez o que tenha ocorrido é que por ser uma dose maior tenha sido suficiente para apresentar o aumento nos níveis séricos de vitamina D3 nas idades de 2, 6, 13 e 22 meses, porém, ela não foi alta o suficiente para apresentar diferença nesses níveis na idade de 31 meses. Talvez, para essa idade, seja necessário uma dosagem ainda maior para que possa ser absorvida de modo que apresente aumento dos níveis de vitamina D3 no soro.

Entretanto, foi observado no presente estudo, que a vitamina D3 ocasionou a modulação nas vias inflamatórias e neurotróficas dos animais em idade mais avançada melhorando a memória espacial e de habituação. Os animais com 31 meses, foram os que mais apresentaram essa modulação através da suplementação com vitamina D3. Este fato pode ter ocorrido, em parte, devido a presença de VDRs e da enzima ativadora da vitamina D, a 1,  $\alpha$ -OHase, no cérebro (Eyles, Smith et al. 2005, Buell and Dawson-Hughes 2008). Logo, pode-se lançar a hipótese de que o metabólito inativo da vitamina D3 pode ter sido convertido em sua forma ativa (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) diretamente no cérebro, e isto explicaria a ação modulatória da vitamina D3 nos mecanismos de memória, vias inflamatórias e neurotróficas nestes animais.

Estudos clínicos vem demonstrando que há uma associação entre os níveis baixos de vitamina D3 e distúrbios de memória episódica, que se referem as informações de contexto espacial. Também tem sido mostrado que a vitamina D3 está associada à um melhor desempenho cognitivo, onde existe um risco de comprometimento cognitivo de até quatro vezes maior em indivíduos com deficiência grave de vitamina D3 (<25 nmol / L) em comparação com indivíduos normais ( $\geq 75$  nmol / L). A deficiência de vitamina D3, também está associada ao aumento do risco de demência de todas as causas (incluindo a doença de Alzheimer) sendo, adicionalmente, evidenciado que há uma associação de deficiência de vitamina D3 com queixas cognitivas subjetivas em pacientes geriátricos (Soni, Kos et al. 2012, Annweiler, Montero-Odasso et al. 2013, Obermann, Morris et al. 2013, Littlejohns, Henley et al. 2014, Tot Babberich Ede, Gourdeau et al. 2015). Estes resultados estão de acordo com os dados do presente estudo que mostram que a suplementação de vitamina D3 42 UI/kg e 420 UI/kg em animais com idade 2 e 6 meses, foi capaz de melhorar o desempenho cognitivo quando comparados aos animais controle dentro de cada idade. O presente estudo também mostrou que os animais considerados envelhecidos com 13, 22 e 31 meses de idade, quando suplementados com vitamina D3 42 UI/kg e ou 420 UI/kg, apresentaram melhor desempenho nas tarefas envolvendo a memória, demonstrando que a vitamina D3 teve ação protetora contra os danos causados pelo envelhecimento, melhorando o desempenho cognitivo dos mesmos. Confirmando, portanto, o efeito neuroprotetor comportamental da vitamina D3 nesses animais.

No estudo de Briones and Darwish (2012) foi avaliado o soro de animais jovens e envelhecidos que ainda não tinham sido suplementados com doses de vitamina

D3. Neste estudo, foi observado que os animais controles envelhecidos apresentavam alta deficiência do metabólito no organismo, cerca de 26% menos que os animais controle jovens, sugerindo assim uma deficiência de vitamina D3 relacionada à idade (Briones and Darwish 2012). Em uma análise posterior, foram comparados animais controles envelhecidos com animais envelhecidos que receberam a suplementação, mostrando que os níveis circulantes de  $1, \alpha$ 25-dihidroxitamina D3, no organismo desses animais controles envelhecidos, eram 32% menores quando comparados aos animais envelhecidos que receberam a suplementação. Estas afirmações certificam os resultados da análise dos níveis de vitamina D3 no soro do presente estudo, onde houve um aumento dos níveis séricos de vitamina D3 nos animais com 2, 6, 13 e 22 meses.

Como existem poucos estudos em relação a resposta à suplementação de vitamina D3, é difícil determinar quais os níveis mais favoráveis para obtenção de efeitos benéficos ao organismo humano (Ross, Manson et al. 2011). Mas sabe-se que os níveis mais baixos de vitamina D3 estão cada vez mais associados aos efeitos negativos para o cérebro humano e de animais inferiores, relacionados principalmente ao déficit cognitivo (Balden, Selvamani et al. 2012). Haja vista estudos relacionados com a deficiência da vitamina D3 e o desenvolvimento de doenças (Spach, Pedersen et al. 2004, Obermann, Morris et al. 2013, Littlejohns, Henley et al. 2014, Tot Babberich Ede, Gourdeau et al. 2015), bem como o advento da suplementação desenfreada da mesma (Ronnefarth and Misselwitz 2000, Tuohimaa 2009), estudos para elucidar os mecanismos subjacentes da vitamina D3, especialmente no que se refere ao envelhecimento e cognição são extremamente necessários.

Os resultados do presente trabalho, de forma geral, mostram que, com o passar da idade, a vitamina D3 apresentou efeito protetor na memória dos animais e, também, de forma geral, com o passar da idade, houve aumento do número de biomarcadores inflamatórios e de fatores neurotróficos envolvidos no efeito da vitamina D3, demonstrando maior número de alterações na idade de 31 meses, mesmo não apresentando alterações nos níveis séricos nesta idade, o que indica que a vitamina D3 teve melhor efeito em animais envelhecidos.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho, sugerem que a vitamina D3 possui uma ação modulatória nos fatores neurotróficos e citocinas pró e anti-inflamatórias, além de prevenir danos à memória espacial e de habituação. Esta hipótese pode ser baseada no fato de que a vitamina D3 foi capaz de reverter o dano causado pelo envelhecimento nas idades de 13 e 22 meses (memória espacial e de habituação), provavelmente por uma modulação dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 em animais com 13 meses, e, em animais com 22 meses, pela modulação de IL-6, IL-10 e NGF. Em animais com 31 meses, o dano do envelhecimento foi revertido somente na dose de 420 UI/kg na memória espacial e, este efeito, pôde ser mediado, pelo menos em parte, por modulação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e os fatores neurotróficos BDNF e NGF. Lembrando que até a idade de 22 meses, a vitamina D3 reverteu o dano de memória espacial nas duas doses, porém, em animais com 31 meses, o dano foi maior, considerando o número maior de marcadores inflamatórios e de fatores neurotróficos envolvidos, e somente a dose maior foi capaz de reverter o dano na memória espacial. Portanto, os resultados do presente estudo corroboram a hipótese de que a vitamina D3 pode exercer uma ação imunomoduladora sobre o envelhecimento. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar o efeito da vitamina D3 sobre a imunosenescência, pois os resultados aqui apresentados, mostraram que a regulação das citocinas e fatores neurotróficos podem ser complexas no SNC.

## Referências

- Al-Harbi, A. N., K. M. Khan and A. Rahman (2017). "Developmental Vitamin D Deficiency Affects Spatial Learning in Wistar Rats." J Nutr **147**(9): 1795-1805.
- Al-Shawi, R., A. Hafner, J. Olsen, S. Chun, S. Raza, C. Thrasivoulou, S. Lovestone, R. Killick, P. Simons and T. Cowen (2008). "Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system." Eur J Neurosci **27**(8): 2103-2114.
- Allen, S. J., J. J. Watson, D. K. Shoemark, N. U. Barua and N. K. Patel (2013). "GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration." Pharmacology & Therapeutics **138**(2): 155-175.
- Alrefaie, Z. and A. Alhayani (2015). "Vitamin D(3) improves decline in cognitive function and cholinergic transmission in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats." Behav Brain Res **287**: 156-162.
- Annweiler, C., G. Allali, P. Allain, S. Bridenbaugh, A. M. Schott, R. W. Kressig and O. Beauchet (2009). "Vitamin D and cognitive performance in adults: a systematic review." Eur J Neurol **16**(10): 1083-1089.
- Annweiler, C., R. Bartha, S. N. Karras, J. Gautier, F. Roche and O. Beauchet (2015). "Vitamin D and white matter abnormalities in older adults: a quantitative volumetric analysis of brain MRI." Exp Gerontol **63**: 41-47.
- Annweiler, C., M. Montero-Odasso, D. J. Llewellyn, S. Richard-Devantoy, G. Duque and O. Beauchet (2013). "Meta-analysis of memory and executive dysfunctions in relation to vitamin D." J Alzheimers Dis **37**(1): 147-171.
- Balden, R., A. Selvamani and F. Sohrabji (2012). "Vitamin D deficiency exacerbates experimental stroke injury and dysregulates ischemia-induced inflammation in adult rats." Endocrinology **153**(5): 2420-2435.
- Bartsch, T. and P. Wulff (2015). "The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability." Neuroscience **309**: 1-16.
- Bishop, N. A., T. Lu and B. A. Yankner (2010). "Neural mechanisms of ageing and cognitive decline." Nature **464**(7288): 529-535.
- Borba Lde, O., A. N. Guimaraes, A. Mazza Vde and M. A. Maftum (2012). "[Mental health care based on the psychosocial model: reports of relatives and persons with mental disorders]." Rev Esc Enferm USP **46**(6): 1406-1414.
- Briones, T. L. and H. Darwish (2012). "Vitamin D mitigates age-related cognitive decline through the modulation of pro-inflammatory state and decrease in amyloid burden." J Neuroinflammation **9**: 244.

Briones, T. L. and H. Darwish (2014). "Decrease in age-related tau hyperphosphorylation and cognitive improvement following vitamin D supplementation are associated with modulation of brain energy metabolism and redox state." Neuroscience **262**: 143-155.

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

Buell, J. S. and B. Dawson-Hughes (2008). "Vitamin D and neurocognitive dysfunction: preventing "D"ecline?" Mol Aspects Med **29**(6): 415-422.

Buell, J. S., B. Dawson-Hughes, T. M. Scott, D. E. Weiner, G. E. Dallal, W. Q. Qui, P. Bergethon, I. H. Rosenberg, M. F. Folstein, S. Patz, R. A. Bhadelia and K. L. Tucker (2010). "25-Hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services." Neurology **74**(1): 18-26.

Buell, J. S., T. M. Scott, B. Dawson-Hughes, G. E. Dallal, I. H. Rosenberg, M. F. Folstein and K. L. Tucker (2009). "Vitamin D is associated with cognitive function in elders receiving home health services." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(8): 888-895.

Burke, S. N. and C. A. Barnes (2006). "Neural plasticity in the ageing brain." Nat Rev Neurosci **7**(1): 30-40.

Burnet, F. M. (1974). "Intrinsic mutagenesis, an interpretation of the pathogenesis of xeroderma pigmentosum." Lancet **2**(7879): 495-498.

Campos, C., N. B. Rocha, E. Lattari, F. Paes, A. E. Nardi and S. Machado (2016). "Exercise-induced neuroprotective effects on neurodegenerative diseases: the key role of trophic factors." Expert Rev Neurother **16**(6): 723-734.

Casaccia-Bonnet, P., G. Pandozy and F. Mastronardi (2008). "Evaluating epigenetic landmarks in the brain of multiple sclerosis patients: a contribution to the current debate on disease pathogenesis." Prog Neurobiol **86**(4): 368-378.

Cesari, M., B. Vellas and G. Gambassi (2013). "The stress of aging." Experimental Gerontology **48**(4): 451-456.

Chao, M. V., R. Rajagopal and F. S. Lee (2006). "Neurotrophin signalling in health and disease." Clin Sci (Lond) **110**(2): 167-173.

Chao, Y. C., F. Xie, X. Li, R. Guo, N. Yang, C. Zhang, R. Shi, Y. Guan, Y. Yue and Y. Wang (2016). "Demethylation regulation of BDNF gene expression in dorsal root ganglion neurons is implicated in opioid-induced pain hypersensitivity in rats." Neurochem Int **97**: 91-98.

Cheng, J., Y. Rui, L. Qin, J. Xu, S. Han, L. Yuan, X. Yin and Z. Wan (2017). "Vitamin D Combined with Resveratrol Prevents Cognitive Decline in SAMP8 Mice." Curr Alzheimer Res **14**(8): 820-833.

Cheng, J., X. Xia, Y. Rui, Z. Zhang, L. Qin, S. Han and Z. Wan (2016). "The combination of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> with resveratrol improves neuronal degeneration by regulating endoplasmic reticulum stress, insulin signaling and inhibiting tau hyperphosphorylation in SH-SY5Y cells." Food Chem Toxicol **93**: 32-40.

Collin, C., K. E. Assmann, M. Deschasaux, V. A. Andreeva, C. Lemogne, N. Charnaux, A. Sutton, S. Hercberg, P. Galan, M. Touvier and E. Kesse-Guyot (2016). "Plasma vitamin D status and recurrent depressive symptoms in the French SU.VI.MAX cohort." Eur J Nutr.

Conrad, C. D., S. J. Lupien, L. C. Thanasoulis and B. S. McEwen (1997). "The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze." Brain Res **759**(1): 76-83.

Correale, J., M. C. Ysraelit and M. I. Gaitan (2009). "Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis." Brain **132**(Pt 5): 1146-1160.

Cowansage, K. K., J. E. LeDoux and M. H. Monfils (2010). "Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity." Curr Mol Pharmacol **3**(1): 12-29.

Cristofalo, V. J., G. S. Gerhard and R. J. Pignolo (1994). "Molecular biology of aging." Surg Clin North Am **74**(1): 1-21.

Cui, X., H. Gooch, A. Petty, J. J. McGrath and D. Eyles (2017). "Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions." Mol Cell Endocrinol **453**: 131-143.

Davinelli, S., M. Maes, G. Corbi, A. Zarrelli, D. C. Willcox and G. Scapagnini (2016). "Dietary phytochemicals and neuro-inflammaging: from mechanistic insights to translational challenges." Immun Ageing **13**: 16.

Dawson-Hughes, B., S. S. Harris, N. J. Palermo, L. Ceglia and H. Rasmussen (2013). "Meal conditions affect the absorption of supplemental vitamin D<sub>3</sub> but not the plasma 25-hydroxyvitamin D response to supplementation." J Bone Miner Res **28**(8): 1778-1783.

Deacon, R. M., E. Koros, K. D. Bornemann and J. N. Rawlins (2009). "Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests." Behav Brain Res **197**(2): 466-468.

Deacon, R. M. and J. N. Rawlins (2006). "T-maze alternation in the rodent." Nat Protoc **1**(1): 7-12.

Dellu, F., A. Contarino, H. Simon, G. F. Koob and L. H. Gold (2000). "Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice." Neurobiol Learn Mem **73**(1): 31-48.

Dellu, F., V. Fauchey, M. Le Moal and H. Simon (1997). "Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes." Neurobiol Learn Mem **67**(2): 112-120.

Dhesi, J. K., S. H. Jackson, L. M. Bearne, C. Moniz, M. V. Hurley, C. G. Swift and T. J. Allain (2004). "Vitamin D supplementation improves neuromuscular function in older people who fall." Age Ageing **33**(6): 589-595.

Dougherty, K. A., M. F. Dilisio and D. K. Agrawal (2016). "Vitamin D and the immunomodulation of rotator cuff injury." J Inflamm Res **9**: 123-131.

Dragneva, L. A., V. A. Isaeva, N. V. Blazhevich and V. B. Spirichov (1966). "[The effect of vitamin D2 on AT-phosphatase activity of the brain]." Vopr Pitan **25**(1): 24-29.

Esiri, M. M. (2007). "Ageing and the brain." J Pathol **211**(2): 181-187.

Esposito, D., P. Patel, R. M. Stephens, P. Perez, M. V. Chao, D. R. Kaplan and B. L. Hempstead (2001). "The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor." J Biol Chem **276**(35): 32687-32695.

Eyles, D. W., F. Feron, X. Cui, J. P. Kesby, L. H. Harms, P. Ko, J. J. McGrath and T. H. Burne (2009). "Developmental vitamin D deficiency causes abnormal brain development." Psychoneuroendocrinology **34 Suppl 1**: S247-257.

Eyles, D. W., S. Smith, R. Kinobe, M. Hewison and J. J. McGrath (2005). "Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain." J Chem Neuroanat **29**(1): 21-30.

Fahnestock, M., B. Michalski, B. Xu and M. D. Coughlin (2001). "The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease." Mol Cell Neurosci **18**(2): 210-220.

Fischer, R. and O. Maier (2015). "Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF." Oxid Med Cell Longev **2015**: 610813.

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

Franceschi, C., M. Bonafe, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani and G. De Benedictis (2000). "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence." Ann N Y Acad Sci **908**: 244-254.

Franceschi, C. and J. Campisi (2014). "Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **69 Suppl 1**: S4-9.

Franceschi, C., M. Capri, D. Monti, S. Giunta, F. Olivieri, F. Sevini, M. P. Panourgia, L. Invidia, L. Celani, M. Scurti, E. Cevenini, G. C. Castellani and S. Salvioli (2007). "Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans." Mech Ageing Dev **128**(1): 92-105.

Gabrysova, L., A. Howes, M. Saraiva and A. O'Garra (2014). "The regulation of IL-10 expression." Curr Top Microbiol Immunol **380**: 157-190.

Garcion, E., N. Wion-Barbot, C. N. Montero-Menei, F. Berger and D. Wion (2002). "New clues about vitamin D functions in the nervous system." Trends Endocrinol Metab **13**(3): 100-105.

Godbout, J. P., J. Chen, J. Abraham, A. F. Richwine, B. M. Berg, K. W. Kelley and R. W. Johnson (2005). "Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system." Faseb j **19**(10): 1329-1331.

Groves, N. J., J. J. McGrath and T. H. Burne (2014). "Vitamin D as a neurosteroid affecting the developing and adult brain." Annu Rev Nutr **34**: 117-141.

Gruver, A. L., L. L. Hudson and G. D. Sempowski (2007). "Immunosenescence of ageing." J Pathol **211**(2): 144-156.

Hanafy, M. M., E. S. Hassanein and S. el Khateeb (1967). "Benign intracranial hypertension in vitamin D deficiency rickets associated with malnutrition." J Trop Pediatr Afr Child Health **13**(1): 19-22.

Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.

Hayes, C. E. (2000). "Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis." Proc Nutr Soc **59**(4): 531-535.

Hayflick, L. (2000). "The future of ageing." Nature **408**(6809): 267-269.

Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.

Heidary, M., N. Rakhshi, M. Pahlevan Kakhki, M. Behmanesh, M. H. Sanati, N. Sanadgol, H. Kamaladini and A. Nikravesch (2014). "The analysis of correlation between IL-1B gene expression and genotyping in multiple sclerosis patients." J Neurol Sci **343**(1-2): 41-45.

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

Hsieh, H. L. and C. M. Yang (2013). "Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases." Biomed Res Int **2013**: 484613.

Hubackova, S., K. Krejcikova, J. Bartek and Z. Hodny (2012). "Interleukin 6 signaling regulates promyelocytic leukemia protein gene expression in human normal and cancer cells." J Biol Chem **287**(32): 26702-26714.

IBGE, Instituto brasileiro de geografia e estatística. Projeção da população por sexo e idade: Brasil 2000-2060 Unidades da Federação 2000-2030. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em:

<<https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000014425608112013563329137649.pdf>>.

Ismail, Z., M. Q. Nguyen, C. E. Fischer, T. A. Schweizer, B. H. Mulsant and D. Mamo (2011). "Neurobiology of delusions in Alzheimer's disease." Curr Psychiatry Rep **13**(3): 211-218.

Izquierdo, I., D. M. Barros, T. Mello e Souza, M. M. de Souza, L. A. Izquierdo and J. H. Medina (1998). "Mechanisms for memory types differ." Nature **393**(6686): 635-636.

Izquierdo, I. and J. H. Medina (1997). "Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures." Neurobiol Learn Mem **68**(3): 285-316.

Ji, C., C. Song and P. Zuo (2011). "The mechanism of memory impairment induced by Abeta chronic administration involves imbalance between cytokines and neurotrophins in the rat hippocampus." Curr Alzheimer Res **8**(4): 410-420.

Jia, F., B. Wang, L. Shan, Z. Xu, W. G. Staal and L. Du (2015). "Core symptoms of autism improved after vitamin D supplementation." Pediatrics **135**(1): e196-198.

Kalueff, A. V. and P. Tuohimaa (2007). "Neurosteroid hormone vitamin D and its utility in clinical nutrition." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **10**(1): 12-19.

Kennedy, K. M., E. D. Reese, M. M. Horn, A. N. Sizemore, A. K. Unni, M. E. Meerbrey, A. G. Kalich, Jr. and K. M. Rodrigue (2015). "BDNF val66met polymorphism affects aging of multiple types of memory." Brain Res **1612**: 104-117.

Kesby, J. P., D. W. Eyles, T. H. Burne and J. J. McGrath (2011). "The effects of vitamin D on brain development and adult brain function." Mol Cell Endocrinol **347**(1-2): 121-127.

Khairova, R. A., R. Machado-Vieira, J. Du and H. K. Manji (2009). "A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder." Int J Neuropsychopharmacol **12**(4): 561-578.

Komulainen, P., M. Pedersen, T. Hanninen, H. Bruunsgaard, T. A. Lakka, M. Kivipelto, M. Hassinen, T. H. Rauramaa, B. K. Pedersen and R. Rauramaa (2008). "BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: the DR's EXTRA Study." Neurobiol Learn Mem **90**(4): 596-603.

Korte, M., P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, H. Thoenen and T. Bonhoeffer (1995). "Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8856-8860.

Kurenova, E. V. and J. M. Mason (1997). "Telomere functions. A review." Biochemistry (Mosc) **62**(11): 1242-1253.

Latimer, C. S., L. D. Brewer, J. L. Searcy, K. C. Chen, J. Popovic, S. D. Kraner, O. Thibault, E. M. Blalock, P. W. Landfield and N. M. Porter (2014). "Vitamin D prevents

cognitive decline and enhances hippocampal synaptic function in aging rats." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(41): E4359-4366.

Lee, C. K., R. Weindruch and T. A. Prolla (2000). "Gene-expression profile of the ageing brain in mice." Nat Genet **25**(3): 294-297.

Lee, J. Y., S. Kho, H. B. Yoo, S. Park, J. S. Choi, J. S. Kwon, K. R. Cha and H. Y. Jung (2014). "Spatial memory impairments in amnesic mild cognitive impairment in a virtual radial arm maze." Neuropsychiatr Dis Treat **10**: 653-660.

Lee, R., P. Kermani, K. K. Teng and B. L. Hempstead (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." Science **294**(5548): 1945-1948.

Li, L., M. Xu, B. Shen, M. Li, Q. Gao and S. G. Wei (2016). "Moderate exercise prevents neurodegeneration in D-galactose-induced aging mice." Neural Regen Res **11**(5): 807-815.

Lichtenstein, A., M. Ferreira-Junior, M. M. Sales, F. B. Aguiar, L. A. Fonseca, N. M. Sumita and A. J. Duarte (2013). "Vitamin D: non-skeletal actions and rational use." Rev Assoc Med Bras **59**(5): 495-506.

Littlejohns, T. J., W. E. Henley, I. A. Lang, C. Annweiler, O. Beauchet, P. H. Chaves, L. Fried, B. R. Kestenbaum, L. H. Kuller, K. M. Langa, O. L. Lopez, K. Kos, M. Soni and D. J. Llewellyn (2014). "Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease." Neurology **83**(10): 920-928.

Llewellyn, D. J., K. M. Langa and I. A. Lang (2009). "Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and cognitive impairment." J Geriatr Psychiatry Neurol **22**(3): 188-195.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Martin, S., M. Jones, E. Simpson and M. van den Buuse (2003). "Impaired spatial reference memory in aromatase-deficient (ArKO) mice." Neuroreport **14**(15): 1979-1982.

Matchar, D. B., C. L. Chei, Z. X. Yin, V. Koh, B. Chakraborty, X. M. Shi and Y. Zeng (2016). "Vitamin D Levels and the Risk of Cognitive Decline in Chinese Elderly People: the Chinese Longitudinal Healthy Longevity Survey." J Gerontol A Biol Sci Med Sci.

Medeiros, F. M., J. de Carvalho Myskiw, P. P. A. Baptista, L. T. Neves, L. A. Martins, C. R. G. Furini, I. Izquierdo, L. L. Xavier, K. Hollands and R. G. Mestriner (2018). "Can an aversive, extinction-resistant memory trigger impairments in walking adaptability? An experimental study using adult rats." Neurosci Lett **665**: 224-228.

Miller, W. L. and A. A. Portale (2000). "Vitamin D 1 alpha-hydroxylase." Trends Endocrinol Metab **11**(8): 315-319.

Minciullo, P. L., A. Catalano, G. Mandraffino, M. Casciaro, A. Crucitti, G. Maltese, N. Morabito, A. Lasco, S. Gangemi and G. Basile (2016). "Inflammaging and Anti-

Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **64**(2): 111-126.

Miroliaee, A. E., J. Salamzadeh, S. Shokouhi and Z. Sahraei (2018). "The study of vitamin D administration effect on CRP and Interleukin-6 as prognostic biomarkers of ventilator associated pneumonia." J Crit Care **44**: 300-305.

Mora-Gallegos, A., M. Rojas-Carvajal, S. Salas, A. Saborio-Arce, J. Fornaguera-Trias and J. C. Brenes (2015). "Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry." Neurobiol Learn Mem **118**: 96-104.

Mpandzou, G., E. Ait Ben Haddou, W. Regragui, A. Benomar and M. Yahyaoui (2016). "Vitamin D deficiency and its role in neurological conditions: A review." Rev Neurol (Paris) **172**(2): 109-122.

Murer, M. G., Q. Yan and R. Raisman-Vozari (2001). "Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." Prog Neurobiol **63**(1): 71-124.

Naghavi Gargari, B., M. Behmanesh, Z. Shirvani Farsani, M. Pahlevan Kakhki and A. R. Azimi (2015). "Vitamin D supplementation up-regulates IL-6 and IL-17A gene expression in multiple sclerosis patients." Int Immunopharmacol **28**(1): 414-419.

Nossov, S., J. S. Dines, G. A. Murrell, S. A. Rodeo and A. Bedi (2014). "Biologic augmentation of tendon-to-bone healing: scaffolds, mechanical load, vitamin D, and diabetes." Instr Course Lect **63**: 451-462.

Nykjaer, A., R. Lee, K. K. Teng, P. Jansen, P. Madsen, M. S. Nielsen, C. Jacobsen, M. Kliemannel, E. Schwarz, T. E. Willnow, B. L. Hempstead and C. M. Petersen (2004). "Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death." Nature **427**(6977): 843-848.

O'Loan, J., D. W. Eyles, J. Kesby, P. Ko, J. J. McGrath and T. H. Burne (2007). "Vitamin D deficiency during various stages of pregnancy in the rat; its impact on development and behaviour in adult offspring." Psychoneuroendocrinology **32**(3): 227-234.

Obermann, K. R., J. C. Morris and C. M. Roe (2013). "Exploration of 100 commonly used drugs and supplements on cognition in older adults." Alzheimers Dement **9**(6): 724-732.

Olivieri, F., M. C. Albertini, M. Orciani, A. Ceka, M. Cricca, A. D. Procopio and M. Bonafe (2015). "DNA damage response (DDR) and senescence: shuttled inflammatoryRNAs on the stage of inflamm-aging." Oncotarget **6**(34): 35509-35521.

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>.

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

Packard, M. G. and N. M. White (1991). "Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists." Behav Neurosci **105**(2): 295-306.

Pang, Q., X. Qi, Y. Jiang, O. Wang, M. Li, X. Xing, J. Dong and W. Xia (2016). "Clinical and genetic findings in a Chinese family with VDR-associated hereditary vitamin D-resistant rickets." Bone Res **4**: 16018.

Patterson, S. L. (2015). "Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1beta, BDNF and synaptic plasticity." Neuropharmacology **96**(Pt A): 11-18.

Petzold, A., L. Psotta, T. Brigadski, T. Endres and V. Lessmann (2015). "Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning." Neurobiol Learn Mem **120**: 52-60.

Prattichizzo, F., V. De Nigris, L. La Sala, A. D. Procopio, F. Olivieri and A. Ceriello (2016). "'Inflammaging' as a Druggable Target: A Senescence-Associated Secretory Phenotype-Centered View of Type 2 Diabetes." Oxid Med Cell Longev **2016**: 1810327.

Prufer, K., T. D. Veenstra, G. F. Jirikowski and R. Kumar (1999). "Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord." J Chem Neuroanat **16**(2): 135-145.

Pruunsild, P., A. Kazantseva, T. Aid, K. Palm and T. Timmusk (2007). "Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters." Genomics **90**(3): 397-406.

Rage, F., M. Silhol, F. Binaime, S. Arancibia and L. Tapia-Arancibia (2007). "Effect of aging on the expression of BDNF and TrkB isoforms in rat pituitary." Neurobiol Aging **28**(7): 1088-1098.

Ramakrishna, T. (1999). "Vitamins and brain development." Physiol Res **48**(3): 175-187.

Ronnefarth, G. and J. Misselwitz (2000). "Nephrocalcinosis in children: a retrospective survey. Members of the Arbeitsgemeinschaft für padiatrische Nephrologie." Pediatr Nephrol **14**(10-11): 1016-1021.

Rosano, C., A. L. Marsland and P. J. Gianaros (2012). "Maintaining brain health by monitoring inflammatory processes: a mechanism to promote successful aging." Aging Dis **3**(1): 16-33.

Ross, A. C., J. E. Manson, S. A. Abrams, J. F. Aloia, P. M. Brannon, S. K. Clinton, R. A. Durazo-Arvizu, J. C. Gallagher, R. L. Gallo, G. Jones, C. S. Kovacs, S. T. Mayne, C. J.

Rosen and S. A. Shapses (2011). "The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: what dietetics practitioners need to know." J Am Diet Assoc **111**(4): 524-527.

Samanez-Larkin, G. R. and B. Knutson (2015). "Decision making in the ageing brain: changes in affective and motivational circuits." Nat Rev Neurosci **16**(5): 278-289.

Scherling, C. S., S. E. Wilkins, J. Zakrezewski, J. H. Kramer, B. L. Miller, M. W. Weiner and H. J. Rosen (2016). "Decreased Self-Appraisal Accuracy on Cognitive Tests of Executive Functioning Is a Predictor of Decline in Mild Cognitive Impairment." Front Aging Neurosci **8**: 120.

Schlogl, M. and M. F. Holick (2014). "Vitamin D and neurocognitive function." Clin Interv Aging **9**: 559-568.

Sengupta, P. (2013). "The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's." Int J Prev Med **4**(6): 624-630.

Shimizu, E., K. Hashimoto, N. Okamura, K. Koike, N. Komatsu, C. Kumakiri, M. Nakazato, H. Watanabe, N. Shinoda, S. Okada and M. Iyo (2003). "Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants." Biol Psychiatry **54**(1): 70-75.

Siegel, G. J. and N. B. Chauhan (2000). "Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain." Brain Res Brain Res Rev **33**(2-3): 199-227.

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.

Simpson, R. J., A. Hammacher, D. K. Smith, J. M. Matthews and L. D. Ward (1997). "Interleukin-6: structure-function relationships." Protein Sci **6**(5): 929-955.

Slominski, A. T., T. K. Kim, W. Li, A. K. Yi, A. Postlethwaite and R. C. Tuckey (2014). "The role of CYP11A1 in the production of vitamin D metabolites and their role in the regulation of epidermal functions." J Steroid Biochem Mol Biol **144 Pt A**: 28-39.

Soni, M., K. Kos, I. A. Lang, K. Jones, D. Melzer and D. J. Llewellyn (2012). "Vitamin D and cognitive function." Scand J Clin Lab Invest Suppl **243**: 79-82.

Spach, K. M., L. B. Pedersen, F. E. Nashold, T. Kayo, B. S. Yandell, T. A. Prolla and C. E. Hayes (2004). "Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis." Physiol Genomics **18**(2): 141-151.

Sundstrom, P. and J. Salzer (2015). "Vitamin D and multiple sclerosis-from epidemiology to prevention." Acta Neurol Scand **132**(199): 56-61.

Tansey, M. G., M. K. McCoy and T. C. Frank-Cannon (2007). "Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention." Exp Neurol **208**(1): 1-25.

Tapia-Arancibia, L., E. Aliaga, M. Silhol and S. Arancibia (2008). "New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease." Brain Research Reviews **59**(1): 201-220.

Tapia-Arancibia, L., F. Rage, L. Givalois and S. Arancibia (2004). "Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function." Frontiers in Neuroendocrinology **25**(2): 77-107.

Taylor, J. M., B. S. Main and P. J. Crack (2013). "Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease." Neurochem Int **62**(5): 803-819.

Teng, H. K., K. K. Teng, R. Lee, S. Wright, S. Tevar, R. D. Almeida, P. Kermani, R. Torkin, Z. Y. Chen, F. S. Lee, R. T. Kraemer, A. Nykjaer and B. L. Hempstead (2005). "ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin." J Neurosci **25**(22): 5455-5463.

Teng, K. K. and B. L. Hempstead (2004). "Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems." Cell Mol Life Sci **61**(1): 35-48.

Thacher, T. D. and M. A. Levine (2016). "CYP2R1 mutations causing vitamin D-deficiency rickets." J Steroid Biochem Mol Biol.

Thiel, C. M., J. P. Huston and R. K. Schwarting (1998). "Hippocampal acetylcholine and habituation learning." Neuroscience **85**(4): 1253-1262.

Tonelli, L. H. and T. T. Postolache (2005). "Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and major histocompatibility complex molecules in the normal brain and after peripheral immune challenge." Neurol Res **27**(7): 679-684.

Tot Babberich Ede, N., C. Gourdeau, S. Pointel, B. Lemarchant, O. Beauchet and C. Annweiler (2015). "Biology of subjective cognitive complaint amongst geriatric patients: vitamin D involvement." Curr Alzheimer Res **12**(2): 173-178.

Triaca, V., V. Sposato, G. Bolasco, M. T. Ciotti, P. Pelicci, A. C. Bruni, C. Cupidi, R. Maletta, M. Feligioni, R. Nistico, N. Canu and P. Calissano (2016). "NGF controls APP cleavage by downregulating APP phosphorylation at Thr668: relevance for Alzheimer's disease." Aging Cell **15**(4): 661-672.

Tuohimaa, P. (2009). "Vitamin D and aging." J Steroid Biochem Mol Biol **114**(1-2): 78-84.

Tuohimaa, P., T. Keisala, A. Minasyan, J. Cachat and A. Kalueff (2009). "Vitamin D, nervous system and aging." Psychoneuroendocrinology **34 Suppl 1**: S278-286.

Turner, K. M., J. W. Young, J. J. McGrath, D. W. Eyles and T. H. Burne (2013). "Cognitive performance and response inhibition in developmentally vitamin D (DVD)-deficient rats." Behav Brain Res **242**: 47-53.

Underwood, C. K. and E. J. Coulson (2008). "The p75 neurotrophin receptor." Int J Biochem Cell Biol **40**(9): 1664-1668.

Veenstra, T. D., K. Prufer, C. Koenigsberger, S. W. Brimijoin, J. P. Grande and R. Kumar (1998). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in the central nervous system of the rat embryo." Brain Res **804**(2): 193-205.

Vianna, M. R., M. Alonso, H. Viola, J. Quevedo, F. de Paris, M. Furman, M. L. de Stein, J. H. Medina and I. Izquierdo (2000). "Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat." Learn Mem **7**(5): 333-340.

Vilela, T. C., A. P. Muller, A. P. Damiani, T. P. Macan, S. da Silva, P. B. Canteiro, A. de Sena Casagrande, G. D. S. Pedroso, R. T. Nesi, V. M. de Andrade and R. A. de Pinho (2017). "Strength and Aerobic Exercises Improve Spatial Memory in Aging Rats Through Stimulating Distinct Neuroplasticity Mechanisms." Mol Neurobiol **54**(10): 7928-7937.

Watson, N., B. Ding, X. Zhu and R. D. Frisina (2017). "Chronic inflammation - inflammaging - in the ageing cochlea: A novel target for future presbycusis therapy." Ageing Res Rev **40**: 142-148.

Wrzosek, M., J. Lukaszewicz, M. Wrzosek, A. Jakubczyk, H. Matsumoto, P. Piatkiewicz, M. Radziwon-Zaleska, M. Wojnar and G. Nowicka (2013). "Vitamin D and the central nervous system." Pharmacol Rep **65**(2): 271-278.

You, H. J., J. H. Park, H. Pareja-Galeano, A. Lucia and J. I. Shin (2016). "Targeting MicroRNAs Involved in the BDNF Signaling Impairment in Neurodegenerative Diseases." Neuromolecular Med.

Yu, X. W., M. M. Oh and J. F. Disterhoft (2016). "CREB, cellular excitability, and cognition: implications for aging." Behav Brain Res.

Zhang, Y., Y. Zhang, M. Chen, Y. Zhou and M. Lang (2014). "Galactosylated poly(epsilon-caprolactone) membrane promoted liver-specific functions of HepG2 cells in vitro." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **41**: 52-58.

Zhu, X. O., B. J. McCabe, J. P. Aggleton and M. W. Brown (1997). "Differential activation of the rat hippocampus and perirhinal cortex by novel visual stimuli and a novel environment." Neurosci Lett **229**(2): 141-143.

Ziebell, J. M., R. K. Rowe, M. M. Muccigrosso, J. T. Reddaway, P. D. Adelson, J. P. Godbout and J. Lifshitz (2016). "Aging with a traumatic brain injury: Could behavioral morbidities and endocrine symptoms be influenced by microglial priming?" Brain Behav Immun.

Zimmerman, G. A., M. Meistrell, 3rd, O. Bloom, K. M. Cockroft, M. Bianchi, D. Risucci, J. Broome, P. Farmer, A. Cerami, H. Vlassara and et al. (1995). "Neurotoxicity of advanced glycation endproducts during focal stroke and neuroprotective effects of aminoguanidine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3744-3748.

Zlatar, Z. Z., A. Bischoff-Grethe, C. C. Hays, T. T. Liu, M. J. Meloy, R. A. Rissman, M. W. Bondi and C. E. Wierenga (2016). "Higher Brain Perfusion May Not Support Memory Functions in Cognitively Normal Carriers of the ApoE epsilon4 Allele Compared to Non-Carriers." Front Aging Neurosci **8**: 151.

## Anexo1: Certificado de Aprovação na Comissão de Ético no Uso de Animais



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



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do Efeito Neuroquímico e Comportamental da Vitamina D3 (1 $\alpha$ - 25 Dihidroxitamina D3) em Ratos Wistar Jovens e em Processo de Envelhecimento**", registrada com o protocolo nº **087/2016-1**, sob a responsabilidade de **Josiane Budni**, junto à equipe: **Tatiani Bellettini dos Santos, Michelle Lima Garcez, Francielle Gonçalves Mina, Gustavo Skiavo, Aline Pereira da Luz, Ariadne de Oliveira Marques, Lucas Krasilchik, Julia Budny Serafim** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **26/07/2016**.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/07/2016 a 14/07/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	240
Peso/Idade	250-300g / 2, 6, 13, 22, 31meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**Evaluation of neurochemical and behavioral effect of vitamin D3 (1 $\alpha$ - 25 dihydroxyvitamin D3) in young and old Wistar rats**".

Protocol number: **087/2016-1**

Principal Investigator: **Josiane Budni**

Researchers: **Tatiani Bellettini dos Santos, Michelle Lima Garcez, Francielle Gonçalves Mina, Gustavo Skiavo, Aline Pereira da Luz, Ariadne de Oliveira Marques, Lucas Krasilchik, Julia Budny Serafim**.

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](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 26 de julho de 2016.

  
Jairo José Zocche  
Coordenador da CEUA