

**Atividade da superóxido dismutase em modelo de animal com lesão
Hipocampal induzida por peptídeo A β 1-42 e suplementados com melatonina****Peroxide activity dismutates in animal model with Hypical lesion induced by
peptide A β 1-42 and supplemented with melatonine**

DOI:10.34117/bjdv6n10-328

Recebimento dos originais:08/09/2020

Aceitação para publicação:15/10/2020

Welton Daniel Nogueira Godinho

Mestre, Universidade Estadual do Ceará

E-mail:welton.daniel@uece.br

Isabele Dutra de Aguiar

Graduanda em Educação Física, Universidade Estadual do Ceará

Francisco Sérgio Lopes Vasconcelos Filho

Mestre, Universidade Federal do Ceará

Guilherme Nizan Silva Almeida

Graduado, Universidade Estadual do Ceará

Bruno Felipe da Silva

Graduando em Educação Física, Universidade Estadual do Ceará

Israel Barbosa de Albuquerque

Graduado, Universidade Estadual do Ceará

Vânia Marilande Ceccatto

Doutora, Universidade Estadual do Ceará

Paula Matias Soares

Doutora, Universidade Estadual do Ceará

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se pela neurodegeneração progressiva e irreversível decorrente de lesões moleculares decorrentes do acúmulo de placas neuríticas carregadas de β -amiloide e emaranhados neurofibrilares causando perda progressiva da memória e das funções cognitivas. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar alterações na atividade da superóxido dismutase no hipocampo de ratos induzidos ao Alzheimer e suplementados via gavagem por melatonina. Os animais foram divididos em cinco grupos (N=12): Grupo 1: Controle (não operado) que receberam veículo por gavagem (CONTROLE-SALINA, CS), Grupo 2: animais SHAM (Operação de Alzheimer) que receberam a injeção do veículo de diluição de melatonina (SHAM-SALINA,SS), Grupo 3: animais SHAM que receberam melatonina (SHAM-MELATONINA, SM),

Grupo 4: animais induzidos ao Alzheimer que receberam somente o veículo (ALZHEIMER-SALINA, AS), Grupo 5: animais induzidos ao Alzheimer que receberam melatonina (ALZHEIMER- MELATONINA, AM) e por meio de testes de equilíbrio redox, analisou-se a atividade da superóxido dismutase (SOD) verificando um aumento na defesa antioxidante, inclusive na suplementação do grupo 3. Conclui-se que a Melatonina pode melhorar as defesas antioxidantes em resposta à Doença de Alzheimer.

Palavra-Chave: Alzheimer, Demência, Melatonina e Superóxido Dismutase.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by progressive and irreversible neurodegeneration resulting from molecular lesions resulting from the accumulation of neuritic plaques loaded with β -amyloid and neurofibrillar entanglements causing progressive loss of memory and cognitive functions. Therefore, the objective of this study was to identify alterations in the activity of superoxide dismutase in the hippocampus of rats induced to Alzheimer and supplemented via gavage by melatonin. The animals were divided into five groups (N=12): Group 1: Control (non-operated) that received vehicle by gavage (CONTROLE-SALINA, CS), Group 2: SHAM animals (Alzheimer's Operation) that received the injection of the melatonin dilution vehicle (SHAM-SALINA,SS), Group 3: SHAM animals that received melatonin (SHAM-MELATONINA, SM), Group 4: Alzheimer induced animals that received only the vehicle (ALZHEIMER- SALINA, AS), Group 5: Alzheimer induced animals that received melatonin (ALZHEIMER- MELATONIN, AM) and through redox balance tests, the activity of superoxide dismutase (SOD) was analyzed, verifying an increase in the antioxidant defense, including the supplementation of group 3. It was concluded that Melatonin can improve antioxidant defenses in response to Alzheimer's disease.

keyword: Alzheimer's, Dementia, Melatonin and Superoxide Dismutase.

1 INTRODUÇÃO

A expectativa de vida está aumentando e patologias inesperadas como as doenças neurodegenerativas, aumentam radicalmente devido a novos conhecimentos terapêuticos e farmacológicos (WHO, 2014).



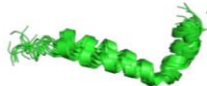
Dentre essas doenças destaca-se a demência, enfermidade neurodegenerativa causada por danos em células nervosas do encéfalo, chamadas de neurônios, que se tornam incapazes de funcionar normalmente e podem morrer. A morte neuronal pode levar a mudanças na memória, comportamento e capacidade de pensar com clareza e, eventualmente, prejudicar a capacidade de realizar funções corporais básicas, como caminhar, alimentar-se, vestir-se, deglutir, etc. As pessoas nos estágios finais da doença ficam impossibilitadas de realizar essas funções sem o auxílio de cuidadores (BEAR, CONNORS, PARDISO, 2008).

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais cotidiana da demência, neste caso, os danos causados ao encéfalo são irreversíveis e não podem ser interrompidos. Caracteriza-se como uma doença neurodegenerativa por lesões moleculares decorrentes do acúmulo de placas neuríticas

carregadas de β - amiloide e emaranhados neurofibrilares causando danos oxidativos e inflamatórios, levando a falhas no metabolismo energético e disfunção sináptica, gerando déficits em diversos neurotransmissores, como acetilcolina, noradrenalina e serotonina (QUERFURTH E LA FERLA, 2010).

Na DA especialmente em comparação com outros tipos de doenças senis os níveis de melatonina estão bem mais diminuídos em relação a indivíduos saudáveis, este e outros indícios nos levam a ideia de que este hormônio poderia servir de estratégia terapêutica na DA, pela patologia apresentar também disfunção do relógio circadiano e processos inflamatórios (HARDELAND, 2012), ademais a substancia apresenta características anti-inflamatórias, antioxidativa, anti-apoptótica (HARDELAND et al., 2011), influencia no metabolismo da glicose (LIMA et al., 1998) em antagonismo com efeitos observados no mal de Alzheimer como resumidos na imagem 1, a dismutação do $O_2 \cdot$ (potencialmente prejudicial à célula) a H_2O_2 é muito rápida e pode ocorrer tanto de forma espontânea como catalizada pela enzima superóxido dismutase sendo essa enzima considerada a primeira defesa antioxidante em diversos contextos (BHATTACHARJEE, 2010).

Imagem 1: efeitos fisiológicos divergentes entre melatonina representado em verde e o mal de Alzheimer representado em vermelho.

✔	Metabolismo da glicose (LIMA et al., 1998)	✘
✔	Anti-inflamatória (MAYO et al., 2005)	✘
✔	Imunomodulatória (GUERRERO & REITER, 2002)	✘
✔	Anti-apoptose (Wu et al., 2011),	✘
✔	Antioxidante (HARDELAND, FUHRBERG, 1996)	✘
✔		✘
		

Fonte: Próprio autor.

2 JUSTIFICATIVA

O numero de idosos no Brasil tem aumentado, a proporção de indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos cresceu de 6% em 1975 para 7,9% em 2000, estimando-se que chegue a 15,4% em 2025 (IZQUIERDO, 2002). Na idade avançada aumenta a incidência de doenças neurodegenerativas, dentre as quais as que se denominam demências.

Com o avanço da idade os níveis de melatonina decaem progressivamente, variando de um indivíduo para outro, essa redução pode ter várias causas: deterioração progressiva do sistema nervoso central (SNC), dificuldade na transmissão neuronal para a pineal (comumente observada em doenças neurodegenerativas) e calcificação da glândula pineal, porém não é apenas no envelhecimento que ela decai, também ocorre em patologias neurológicas, condições estressantes, doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios endócrinos e metabólicos, além de hábitos diários como a alteração do ciclo claro-escuro (HARDELAND, 2012).

É necessário usar um modelo animal quando as limitações para se investigar uma doença humana podem envolver aspectos éticos ou inerentes à própria doença e ao modo de investigação, assim o modelo pela indução de beta amilóide atende aos requisitos por permitir o estudo dos fenômenos biológicos ou de comportamento do animal, induzir um processo patológico espontâneo que pode ser investigado, e apresentar o fenômeno, em um ou mais aspectos, semelhante ao fenômeno em seres humanos (RUSSELL, 2001; SALÉN, 1995).

3 OBJETIVO

O estudo tem como objetivo, comparar em hipocampus de ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de Alzheimer por β -amilóide e suplementados com melatonina, a atividade da enzima antioxidante Super Oxido Dismutase (SOD).

4 METODOLOGIA

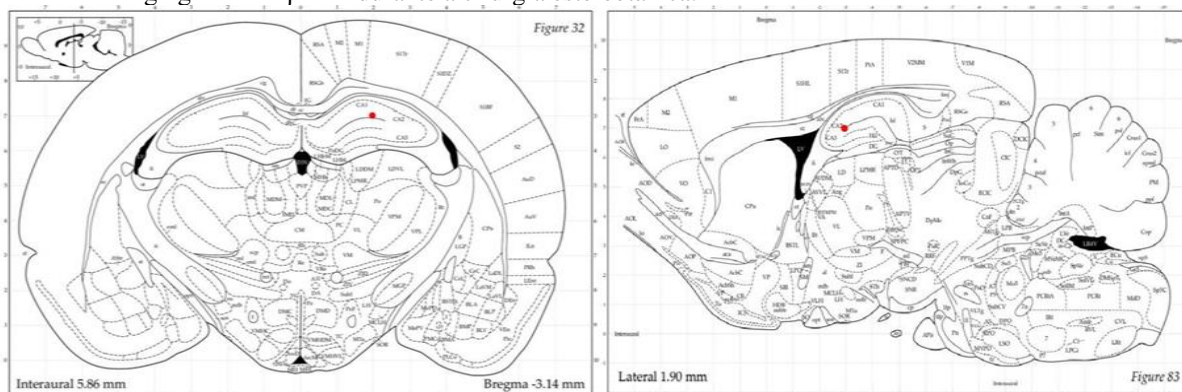
O projeto está aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Estadual do Ceará registrado sob o número 2214971/2017. A pesquisa se desenvolveu no Laboratório de Bioquímica e Expressão Gênica (LABIEX).

Os animais foram divididos em cinco grupos (N=12): Grupo 1: Controle (não operado) que receberam veículo por gavagem (CONTROLE-SALINA, CS)¹, Grupo 2: animais SHAM (Operação de Alzheimer) que receberam a injeção do veículo de diluição de melatonina (SHAM-SALINA,SS), Grupo 3: animais SHAM que receberam melatonina (SHAM-MELATONINA, SM), Grupo 4: animais induzidos ao Alzheimer que receberam somente o veículo (ALZHEIMER- SALINA, AS), Grupo 5: animais induzidos ao Alzheimer que receberam melatonina (ALZHEIMER-MELATONINA, AM).

¹ Os animais do Grupo 1 visavam mostrar que não ocorriam alterações comportamentais no teste do labirinto aquático decorrentes da falsa cirurgia (SHAM), visando evitar sofrimento animal desnecessário os animais não foram utilizados nos testes bioquímicos e histológicos.

Os ratos wistar submeteram-se a uma cirurgia estereotáxica para injeção intrahipocampal de 400 pmol de β -amilóide 1-42 em um volume de 0,5 μ L ou PBS. Para a indução ao Alzheimer, o agregado β -amilóide foi preparado a partir de uma solução de amilóide- β 1-42 (Sigma-Aldrich, Inc.) em solução salina (1 μ g/ μ L) (LEE et al., 2012) com pH 7,4. A solução foi incubada a 37°C durante 3 dias para formar o agregado β -amilóide e armazenado a 70°C. Os animais foram anteriormente anestesiados com a associação de Ketamina (100 mg / kg) e Xilasina (10 mg/kg) 59 59 via intraperitoneal e fixados em estereotáxico (Insight Ltda). Em seguida, foi realizada a tricomia craniana e incisão sagital para expor o bregma no cérebro. A agulha foi então baixada para dentro do cérebro a uma velocidade de 0,8 mm / min e, em seguida, mantida no lugar durante 2 minutos antes de injeção (ZHOUET al., 2014). Posteriormente, o agregado A β foi infundido (1 μ L/3min) (Lee et al., 2012), bilateralmente intracerebroventricular, utilizando uma agulha de calibre 27 ligada a uma micro seringa (Hamilton) com a ajuda do aparelho de estereotaxia nas coordenadas: AP: 0,8 mm ao bregma; LL: 1,5 mm e DV: 3,6 milímetros abaixo da superfície do cérebro (PAXINOS & WATSON, 2009), (figura 2). Após a injeção, a agulha é deixada para repousar no local durante 5 min e em seguida, retirada a uma taxa de 0,4mm/min, para assegurar a adequada difusão (ZHOU et al., 2014). O volume total de injeção intracerebroventricular (ICV) foi de 10 μ L de agregado A β bilateralmente (5 μ L) (ZHANG et al., 2015). Após o procedimento cirúrgico realiza-se a sutura, assepsia com álcool iodado e administrado solução salina (1mL, subcutâneo) para evitar a desidratação.

Figura 2: Área alvejada na cirurgia estereotáxica. O ponto em vermelho indica com precisão o local do hipocampo onde foi inoculado o agregado de A β 1-42 durante a cirurgia estereotáxica.



Fonte: PAXINOS; WATSON, 2009.

4.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Preparo dos homogenatos

Para a homogeneização e extração de proteínas foi utilizado o tampão fosfato de sódio 110mM (pH 7,4). O tampão foi colocado na proporção de dez vezes o peso do tecido por

micrograma. Após a adição do tampão as amostras foram centrifugadas a 14000 RPM durante 20 minutos na temperatura de 4 o C. Após o término da centrifugação foi retirado o sobrenadante dos eppendorfs e armazenados a -80 o C até o seu uso.

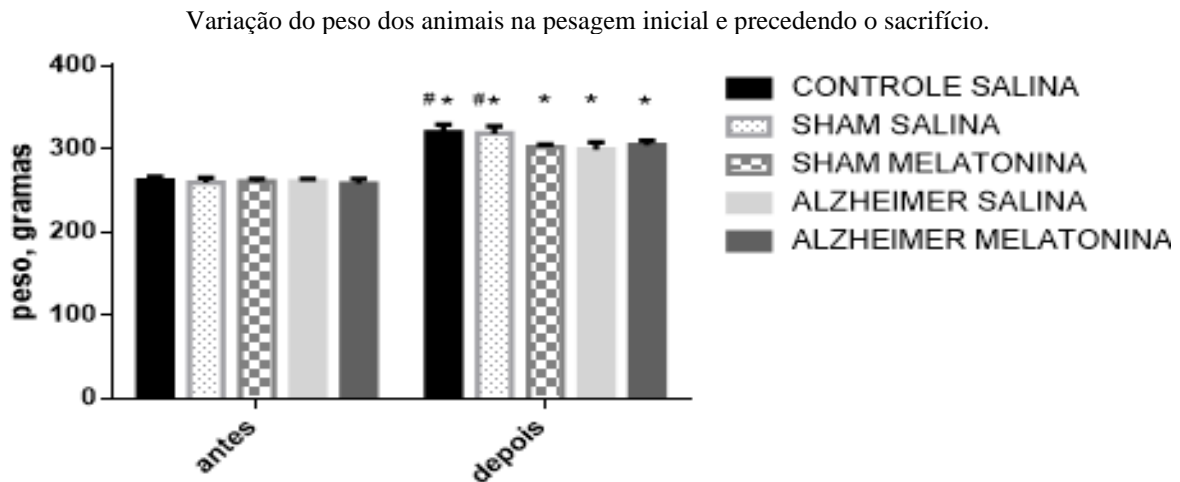
Determinação da Superóxido Desmutase (SOD)

Este ensaio teve como objetivo verificar a auto-oxidação da adrenalina pela ação da Superóxido desmutase. Primeiramente, o ensaio foi realizado com a montagem do “branco” onde foi adicionado 970µL de tampão glicina juntamente com 10µL de catalase e 20µL de adrenalina, lida em espectrofotômetro a 480nm durante 3 minutos em cubetas de quartzo. Após essa análise, foi adicionado 960, 950 ou 930µL de tampão glicina respectivamente com 10, 20 ou 40µL de amostra com 10µL de catalase e 20µL de adrenalina e imediatamente lida em espectrofotômetro a 480nm durante 3 minutos em cubetas de quartzo. Os resultados foram normalizados pelo valor de proteína e expressos em U SOD/mg de proteína (BANNISTER; CALABRESE, 1987).

5 RESULTADOS

5.1 PESO

Após a classificação e distribuição dos animais em seus respectivos grupos, foi realizada a pesagem dos mesmos, não sendo constatada nenhuma diferença estatística entre os grupos (CS, 261,7±5,1g; SS, 259,6±5,6g; SM, 260,4±3,3g; AS, 260,9±3,1g, AM, 258,3±5,7g), resultado em média ± erro padrão. Todavia, ao final do tratamento de aproximadamente quatro semanas, foi identificado diferenças estatísticas entre os grupos (CS, 320,2±8,9g; SS, 318,2±8,9g; apresentando valores de massa corporal superior à SM, 302,3±3,3g; AS, 299,1±8,8g, AM, 304,5±6,1g). No entanto, foi encontrado aumento significativo em todos os grupos quando comparado o peso inicial com o peso final ($p < 0,05$) (Figura 12). O grupo Controle Salina objetiva mostrar que a falsa operação não induz diferença nos resultados de comportamento (grupos SHAM), assim o grupo SS pode ser o grupo controle nos testes subsequentes.



Fonte: Próprio autor.

Figura 12 - Análise da massa corporal dos animais. A partir do teste ANOVA *two-way post hoc Tukey* observamos que houve diferença estatística no peso (g) dos animais entre os grupos no início e no final dos procedimentos experimentais, onde foram identificados diferenças entre os grupos. Verificou-se que ao final dos procedimentos experimentais houve um aumento na massa corporal dos grupos em relação ao seu peso inicial; (*) indica diferença estatística em relação ao mesmo grupo no início dos procedimentos ($p < 0,05$), os grupos S.M, A.S e A.M, diferem dos grupos C.S e S.S, após o tratamento, com p valor de 0,0009, 0,00204 e 0,00454 respectivamente (símbolo #).

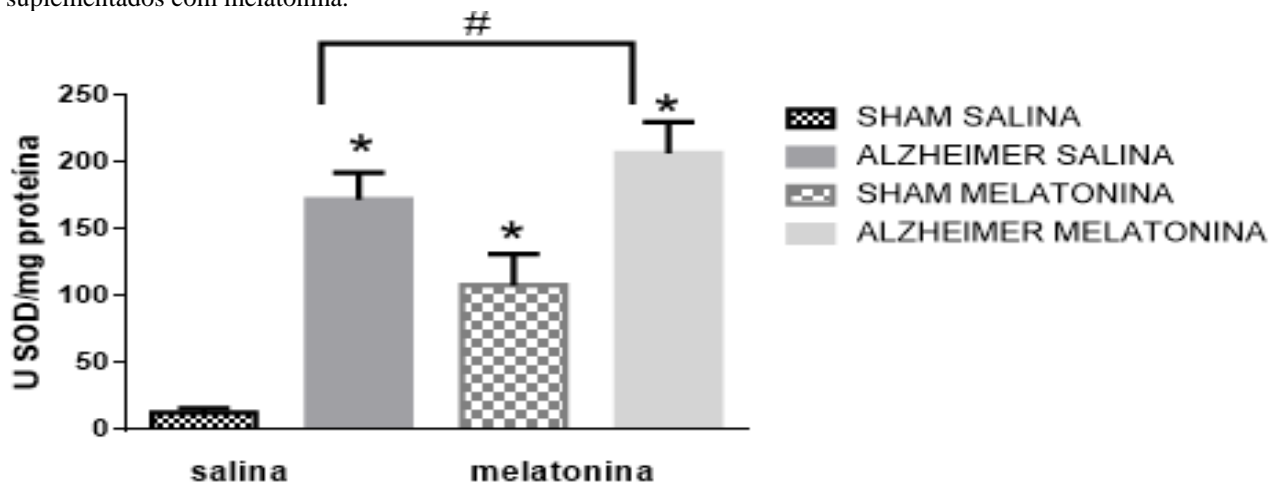
5.2 ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Foi investigado o efeito do agregado de β -amiloide1-42 ($A\beta_{1-42}$), no sistema antioxidante endógeno hipocampal e a resposta da suplementação com MEL, avaliando a atividade das enzimas que combatem o desequilíbrio redox.

Em relação à atividade da superóxido dismutase (SOD), na figura 3 utilizando ANOVA *two-way post hoc Tukey* foi observada diferença significativa entre os grupos rejeitando a hipótese nula (H_0) e $p \text{ value} < 0,001$.

Apresentam os seguintes valores de média, mais erro padrão: SHAM-SALINA, $12,87 \pm 3,26$, ALZHEIMER-SALINA, $172,40 \pm 20,09$, SHAM-MELATONINA, $108,23 \pm 23,25$ E ALZHEIMER-MELATONINA, 207 ± 24 U SOD/mg proteína, ($n=6$).

Figura 3: Resultado na ação da maior atividade da superóxido dismutase em animais induzidos ao Alzheimer e suplementados com melatonina.



Fonte: Próprio autor

Para comparações entre grupos temos que, todos os grupos (AS, SM e AM) diferem do controle SS (*), o grupo que recebeu o agregado (AS) em relação ao grupo controle (SS) tem atividade enzimática da SOD maior com *p value* de 0,0001, AM tem valor de atividade enzimática superior à SS, com *p value* de 0,0209, da mesma forma que o grupo SM ($p < 0,0001$) e *r square* de 0,9082 e o grupo AM ($p < 0,0001$) e *r square* de 0,9757, na comparação entre os grupos induzidos ao Alzheimer (AS x AM), (#), AM tem valor maior de SOD que o grupo AS, com *p value* de 0,0001 e, todos os valores com diferença significativa ($p < 0,05$) e os valores *two-tailed* para o *p value*.

6 DISCUSSÃO

A doença de Alzheimer (DA) está associada a acumulações de peptídeos amiloides ocasionando dano oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação, demência e neurodegeneração, está intimamente relacionada à perda de neurônios, especialmente, em áreas relacionadas à memória, trata-se de uma doença idiopática e de difícil diferenciação entre suas causas ou consequências, o que proporcionou diversas hipóteses e tratamentos inerentes a estas (ZHAO et al., 2012; FARGO; BLEILER, 2014).

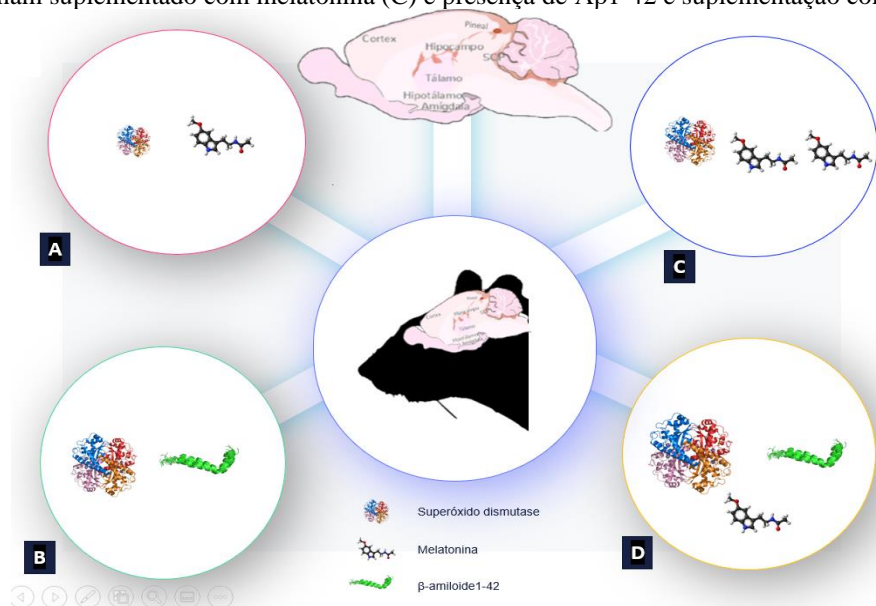
No presente estudo, os animais avaliados ganham peso durante o experimento em relação ao início destes, contudo com diferença entre os grupos no peso final, trabalho de Ferreira em 2015 já sugeriria essa alteração no ganho de peso dos animais suplementados com melatonina (SM e AM), esta ocasionando perda de peso, os animais induzidos a Doença de Alzheimer (AS) também apresentaram peso final inferior ao controle, esses resultados vão de encontro com diversos estudos na literatura (FARLOW et al., 2013; ALBANESE et al., 2013), contudo estes trabalhos são relacionados a perda de peso em pacientes humanos com DA, sem registro em modelo animal.

Presume-se papel da melatonina nos adipócitos, além de efeitos na insulina espécie dependente (CIPOLLA-NETO et al, 2014) e percebe-se essa redução de peso com alteração glicêmica também em animais induzidos ao Alzheimer (MACHADO et al, 2009), ademais os mecanismos exatos responsáveis por essas alterações no peso dos animais devem ser melhores elucidados.

Foi observado também um aumento das defesas antioxidantes, na quantificação da SOD, não há evidência experimental de que o *stress* oxidativo é um fator que inicia DA, entretanto espécies reativas de oxigênio provavelmente desempenham um papel crucial, o que foi apresentado também neste trabalho. Desta forma, encontrar compostos que inibam a geração de espécies reativas de oxigênio deve retardar a progressão da doença. Estas substâncias devem prioritariamente ter capacidade antioxidantes e propriedade de passar a barreira hematoencefálica (POHANKA, 2014).

A melatonina é um antioxidante terminal, não enzimático e não pró-oxidativo (TAN et al., 2002), que possui a capacidade de detoxificação de radicais livres em concentrações fisiológicas e farmacológicas, sendo utilizada em outras pesquisas para prevenir as EROs (REITER et al., 2007), propormos um modelo descrito na figura 4, com uma escala vetorial de tamanho da imagem da SOD refletindo sua ação, atribuímos o aumento do grupo 3 SM à ação de estímulo da MEL na produção das demais enzimas antioxidante, contudo é pertinente mencionar que em outro estudo nosso ainda não publicado, grupo de animais suplementados com melatonina tinham aumento da glicemia após gavagem de glicose em jejum, embora normalizassem a respostas dos animais induzidos ao Alzheimer em valores semelhantes ao controle, assim é necessário maior investigação para avaliar a atuação da MEL em animais saudáveis.

Figura 4: Ilustração quantitativa em escala de tamanho, da superóxido dismutase na melatonina natural (A), presença de A β 1-42 (B), sham suplementado com melatonina (C) e presença de A β 1-42 e suplementação com Melatonina.



Fonte: Próprio autor.

A eficiência antioxidante da melatonina pode ser devido a sua capacidade quelante de radicais livres, ao estímulo exercido sobre a enzima antioxidante, neste estudo em todas as comparações do grupo controle (SS), a MEL (SM), aumentou estatisticamente a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e aumentada em animais com a DA (DUMONT, 2009; GSELL, 2005) corroborando com nossos resultados SS - $12,87 \pm 3,26$, AS - $172,40 \pm 20,09$ U SOD/mg proteína, esta enzima converte o oxigênio prejudicial em peróxido de hidrogênio menos reativo, catalisando a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (figura 5), o aumento da sua atividade está relacionada a tolerância ao estresse (SUN, OBERLEY, LI, 1988).

Figura 5: Ação da superóxido dismutase esta enzima catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células.



Fonte: Próprio autor.

Markesbery, 1996, alerta para diferente atividade enzimática dependendo da região avaliada e que no hipocampo a atividade da SOD é aumentada em stress como a DA, como mencionado anteriormente a MEL induz ao aumento enzimático, o que foi percebido também neste trabalho, com o grupo SM apresentando $108,23 \pm 23,25$ e o grupo submetido ao Alzheimer mais a suplementação (AM) com atividade de 207 ± 24 U SOD/mg proteína, maior atividade da enzima.

7 CONCLUSÃO

A infusão de $A\beta_{1-42}$ foi capaz de gerar alterações comportamentais em curto prazo, foi observada redução no aprendizado, bem como diminuição na memória espacial. Nosso modelo também apresentou a perda de peso característica da doença, além de apresentar aumento do stress oxidativo e número de neurônios apoptóticos, com a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares, as duas lesões que caracterizam a doença de Alzheimer.

A suplementação com Melatonina melhorou as alterações citadas, com redução do peso dos animais, diferença nos resultados dos testes de labirinto aquático, aumento da atividade da enzima Superóxido dismutase.

Desta forma a melatonina parece ser uma ferramenta interessante para manutenção da saúde encefálica e como seus índices diminuem muito com a velhice esta aparenta ter correlação com as doenças senis em especial com a doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- ALBANESE, E. et al. Dementia severity and weight loss: A comparison across eight cohorts. The 10/66 study. *Alzheimer's & Dementia*, v. 9, n. 6, p. 649-656, 2013.
- BANNISTER, J. V, CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.*, 1987.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARDISO, M.A. *Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso*. 3.ed. Porto Alegre:Artmed, 2008.
- BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfi eld: Science Publishers, p.1-30, 2010.
- CAI, H.-Y. et al. Lixisenatide rescues spatial memory and synaptic plasticity from amyloid β protein-induced impairments in rats. *Neuroscience*, v. 277, p. 6-13, 2014.
- J. CIPOLLA-NETO, F. G. AMARAL, S. C. AFECHE2, D. X. TAN, R. J. REITER. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *J. Pineal Res.* 56:371–381, 2014
- DESRUMAUX, C. et al. Increased amyloid- β peptide-induced memory deficits in phospholipid transfer protein (PLTP) gene knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, v. 38, n. 5, p. 817-825, 2013.
- DUMONT, M,WILLE, STACK, N.Y. CALINGASAN, M.F. BEAL, M.T. LinReduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Faseb j.*, n. 23, v. 1, p. 2459-2466, 2009.
- ESPAÑA, J. et al. Intraneuronal β -amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biological psychiatry*, v. 67, n. 6, p. 513- 521, 2010.
- FARGO, K.; BLEILER, L. Alzheimer's Association report. *Alzheimers Dement*, v. 10, p.47-92, 2014.
- FARLOW, M, R. et al. A 24-Week, Randomized, Controlled Trial of Rivastigmine Patch 13.3 mg/24 h Versus 4.6 mg/24 h in Severe Alzheimer's Dementia. *CNS neuroscience & therapeutics*, v. 19, n. 10, p. 745-752, 2013.
- GSELL, W, CONRAD, R, HICKETHIER, M, SOFIC, E, FRÖLICH, L, WICHART, I, JELLINGER, K, MOLL, G, RANSMAYR, G, et al. Diminuição da atividade da catalase, mas inalterada atividade da superóxido dismutase em cérebros de pacientes com demência de tipo Alzheimer. *J Neurochem.* n. 64, v. 3, p. 1216-1223, 1995.
- GUERRERO, J.M.; REITER, R.J. Melatonin-immune system relationships. *Curr: Top Med Chem.*, v.2, p. 167-179, 2002.
- HARDELAND, R. et al. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol.*, v.93, n.3, p.350-384, 2011.

HARDELAND, R. Melatonin in aging and disease - Multiple consequences of reduced secretions, options and limits of treatment. *Aging and Disease*, v.3, n. 2, p. 1-32, 2012.

HARDELAND, R.; FUHRBERG, B. Ubiquitous melatonin - Presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp Biochem Physiol.*, v.2, p. 25-45, 1996.

IZQUIERDO, I. . *Memória*. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, ArtMed, p. 96, 2002.

LEE, M.Y. et al. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Pineal. Res.*, v.42, n.3, p. 297-309, 2007.

LEE, R. et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, v. 294, p.1945-1948, 2001.

LIMA, F. B. et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am. J. Physiol.*, v. 275, n. 6, p. 934-941, 1998.

LIU, X, J. et al. Melatonin protects against amyloid- β -induced impairments of hippocampal LTP and spatial learning in rats. *Synapse*, v. 67, n. 9, p. 626-636, 2013.

MACHADO,J; CARAM, C,L,B; FRANK, A, A; SOARES, E, A; LAKS, J. Estado nutricional na doença de Alzheimer. *Rev Assoc Med Bras* ; v. 55, n. 2. P. 188-191, 2009.

MAURICE, T, LOCKHART, B. P. PRIVAT, A. Amnesia induced in mice by centrally administered β -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain research*, v. 706, n. 2, p. 181-193, 1996.

MAYO, J.C. et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5- methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5- methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J. Neuroimmunol.*, v.165, p.139-149, 2005.

MIGUEL-HIDALGO, J. J. et al. Memantine prevents cognitive impairment and reduces Bcl-2 and caspase 8 immunoreactivity in rats injected with amyloid β 1–40. *European journal of pharmacology*, v. 692, n. 1, p. 38-45, 2012.

PAXINOS, G E WATSON, C E CARRIVE, P E KIRKCALDIE, MTK E ASHWELL, K, *Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Brain*, Elsevier, EUA, pp. 375. ISBN 978-0-12-374237-7, 2009.

POHANKA, M. Doença de Alzheimer e estresse oxidativo: uma revisão. *Curr Med Chem*. 2014; v. 21, n. 3, p. 356-364, 2014.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease Reply. *New England Journal of Medicine*, v.362, n.19, p.1844-1845, 2010.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; TERRON, M. P.; FLORES, L.J.; CZARNOCKI, Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim*, v.54, n.1, p.1-9, 2007.

RUSSELL, B. *História do pensamento ocidental*. São Paulo: Publicações, 2001.

SALÉN, J.C.W. Animal models: principles and problems. 3.ed. Boston: CRC Press, 1995.

SIGURDSSON, E. M. et al. Bilateral injections of amyloid- β 25-35 into the amygdala of young Fischer rats: behavioral, neurochemical, and time dependent histopathological effects. *Neurobiology of aging*, v. 18, n. 6, p. 591-608, 1997.

STEPANICHEV, M. Y. et al. Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25–35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain research bulletin*, v. 61, n. 2, p. 197-205, 2003.

SUN, Y. I, OBERLEY, L. W, LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Envelhecimento ativo: uma política de saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2014.

WU, U. I. et al. Melatonin inhibits microglial activation, reduces pro-inflammatory cytokine levels, and rescues hippocampal neurons of adult rats with acute *Klebsiella pneumoniae* meningitis. *J. Pineal Res.*, v.50, n.2, p.159-170, 2011.

ZHANG, Lu et al. Curcumin improves amyloid β -peptide (1-42) induced spatial memory deficits through BDNF-ERK signaling pathway. *PloS one*, v. 10, n. 6, p. e0131525, 2015.

ZHANG, Qi et al. BDNF promotes EGF-induced proliferation and migration of human fetal neural stem/progenitor cells via the PI3K/Akt pathway. *Molecules*, v. 16, n. 12, p. 10146-10156, 2011.

ZHAO, B.; ZHONG, M.; JIN, K. Neurogenesis and neurodegenerative diseases in human. *Panminerva medica*, v. 50, n. 1, p. 55-64, 2008. 107

ZHAO, Chunmei; DENG, Wei; GAGE, Fred H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, v. 132, n. 4, p. 645-660, 2008.

ZHAO, Wei-Qin et al. Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid β oligomer-induced synaptic disruption. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 10, p. 7619-7632, 2010.

ZHAO, Yang; GONG, Cheng-Xin. From chronic cerebral hypoperfusion to Alzheimer-like brain pathology and neurodegeneration. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 35, n. 1, p. 101-110, 2015.

ZHOU, Wei-wei et al. Decreasing oxidative stress and neuroinflammation with a multifunctional peptide rescues memory deficits in mice with Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 74, p. 50-63, 2014.