

Fernanda Gomes de Queiroz Barros Aragão

**ENVOLVIMENTO DO NEUROPEPTÍDEO Y E DOS
RECEPTORES Y₂ SOBRE AS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS AO
ENVELHECIMENTO E A DOENÇA DE ALZHEIMER:
EVIDÊNCIAS OBTIDAS EM MODELOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel Prediger.

Coorientadora: Dr.^a Ana Cristina Guerra de Souza.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barros Aragão, Fernanda Gomes de Queiroz

O envolvimento do neuropeptídeo Y e dos receptores Y2 sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao envelhecimento e a doença de Alzheimer: evidências obtidas em modelos in vivo e in vitro / Fernanda Gomes de Queiroz Barros Aragão ; orientador, Rui Daniel Prediger ; coorientadora, Ana Cristina Guerra de Souza. - Florianópolis, SC, 2016.

98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Doença de Alzheimer. 3. Envelhecimento. 4. Neuropeptídeo Y. 5. Receptor Y2. I. Prediger, Rui Daniel. II. Guerra de Souza, Ana Cristina. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

"Envolvimento do neuropeptídeo Y e dos receptores Y2 sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao envelhecimento e a Doença de Alzheimer: evidências obtidas em modelos *in vivo* e *in vitro*"

Por

Fernanda Gomes de Queiroz Barros Aragão

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (06/PPGFMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr(a) Rui Daniel Schröder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Giselle Fazzoni Passos (Universidade Federal do Rio de Janeiro)



Dr(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Helena Iturvides Cimarosti (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2016.

Esse trabalho é dedicado a Renato Aristeu Gomes. Avô que se dedicou a família em primeiro lugar e com sua própria vida nos ensinou sobre os valores do amor, da educação e da determinação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu marido, Paulo Aragão, por ter sido compreensivo e me encorajado durante todo o percurso, sem seu apoio este trabalho não seria concluído. Agradeço aos meus pais, avós, meu irmão e meu sobrinho, por estarem ao meu lado a minha vida inteira e sempre encorajado meus estudos. Agradeço a minha gata, Docinho, por me prover companhia, amor e entretenimento. Agradeço à família que ganhei durante esse processo, meus sogros, cunhados e minha sobrinha por todo o carinho.

Agradeço ao prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger pela orientação durante todo este trabalho, desde a concepção da ideia a sua escrita. Agradeço a Dr.^a Ana Cristina Guerra de Souza pela sua orientação, principalmente ao me ensinar o manejo de animais e sobre os experimentos comportamentais. Agradeço a prof.^a Dr.^a Claudia Pinto Figueiredo por me acolher em seu grupo, pela orientação em um momento crucial da elaboração deste trabalho, e por não poupar esforços para que os experimentos finais dessa dissertação acontecessem.

Agradeço aos integrantes do LEXDON (Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas) por todo o apoio, conselhos e sugestões. Agradeço principalmente aos alunos por nossas conversas e discussões em seminários, foram um grande aprendizado.

Agradeço aos integrantes do LAPEX (Laboratório de Patologia Experimental) pela hospitalidade e por toda a ajuda. Em especial, agradeço as então alunas Bianca Mattos, Camila Verneck, Julia Sena, Julyane Wenderrosky, Paula Frost, Pillar Gama e Tamara Pinheiro pela ajuda durante os experimentos.

Agradeço também ao prof. Dr. Sérgio T. Ferreira que gentilmente cedeu-nos os oligômeros de β -amilóide e toda sua sabedoria sobre o tema. Agradeço também aos alunos de seu laboratório, principalmente ao Felipe Campos, Helen Melo e Natalia Lyra pela paciência e ajuda.

Agradeço a Luzia Weiden e seu filho, Daniel Akira Umezawa, a quem tive a boa sorte de conhecer, que me acolheram e me ajudaram altruisticamente quando em uma cidade estranha. Agradeço a BSGI, ao meu mestre de vida, Daisaku Ikeda, e aos ensinamentos do budismo de Nichiren Daishonin, que me guiaram e nutriram meu espírito durante o percurso.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro concedidos pelos Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

O inverno nunca falha em se tornar primavera.
(Nichiren Daishonin, 1275).

Nam-Myoho-Rengue-Kyo.
(Nichiren Daishonin, 1253).

RESUMO

Diversas evidências indicam que há um comprometimento da sinalização do neuropeptídeo Y (NPY) no sistema nervoso central (SNC) tanto no envelhecimento quanto na doença de Alzheimer (DA), e que este possa representar um novo alvo terapêutico para o alívio de diversos sintomas associados a estas condições. Nesse trabalho foi avaliado o efeito da administração central do NPY sobre prejuízos cognitivos associados ao envelhecimento em camundongos C57BL/6 com 2 e 11 meses de idade. Também foi avaliado o efeito do pré-tratamento com NPY ou com o agonista seletivo do receptor Y_2 (NPY₍₁₃₋₃₆₎) sobre os prejuízos comportamentais induzidos por oligômeros de β -amilóide (A β O) em camundongos suíços adultos, um modelo animal da DA. Ademais, foram avaliados os efeitos do NPY e do NPY₍₁₃₋₃₆₎ sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida por A β O em cultura neuronal hipocampal de ratos Wistar. Uma única injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de NPY (23,4 pmol) foi capaz de reverter o prejuízo de memória espacial associado ao envelhecimento em camundongos C57BL/6 com 11 meses de idade avaliados no teste de localização de objetos. Entretanto, a administração i.c.v. da mesma dose de NPY prejudicou o desempenho de camundongos com 2 meses de idade no mesmo teste. A injeção i.c.v. de A β O (10 pmol) em camundongos suíços induziu prejuízos em memórias de reconhecimento e espacial de curto prazo, evidenciados pelos testes de reconhecimento e localização de objetos, respectivamente, sendo que o pré-tratamento com NPY (23,4 pmol, i.c.v.) foi capaz de prevenir estes prejuízos induzidos pelos A β O. A ativação dos receptores Y_2 pelo agonista NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol, i.c.v.) foi capaz de prevenir os prejuízos na memória espacial de curto prazo nos camundongos, além de prevenir a geração de ROS induzidas por A β O (0,5 μ M) *in vitro*. Nenhum dos compostos avaliados (NPY, NPY₍₁₃₋₃₆₎ e A β O) alterou significativamente os parâmetros comportamentais relacionados à emocionalidade avaliados nos testes do *splash* e nado forçado. Por fim, a administração do NPY prejudicou a discriminação olfatória de camundongos suíços. Os resultados desse trabalho em conjunto com a literatura suportam a hipótese de que a restauração dos níveis de NPY e o uso de agonistas dos receptores Y_2 representam estratégias com potencial para o controle dos prejuízos cognitivos associados ao envelhecimento e observados em fases iniciais da DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. 1. Neuropeptídeo Y. 2. Receptor Y₂. 3. Envelhecimento. 4.

ABSTRACT

Several evidences indicate that the neuropeptide Y (NPY) signaling is compromised in the central nervous system during ageing and Alzheimer's disease (AD), and that this may represent a new therapy target for the relief of symptoms associated with these conditions. At the present work, the effect of central administration of NPY over the cognitive deficits associated to ageing was evaluated in C57BL/6 mice at 2 and 11 months of age. It was also evaluated the effect of pre-treatment with NPY or the Y₂ receptor selective agonist NPY₍₁₃₋₃₆₎ over the behavioral deficits due to amyloid- β oligomers (A β O) administration in adult Swiss mice, an animal model of AD. Moreover, the effects of NPY or NPY₍₁₃₋₃₆₎ over the reactive oxygen species production (ROS) induced by A β O were evaluated in a Wistar rat neuronal hippocampi cell culture. A solely NPY (23,4 pmol) intracerebroventricular (i.c.v.) injection was enough to revert the spatial memory deficit associated with ageing evaluated by the object location test in C57BL/6 mice at 11 months of age. However, the same dose of NPY impaired the performance of mice at 2 months of age at the same test. An i.c.v. injection of A β O (10 pmol) induced recognition and spatial short-term memory deficits highlighted by the object recognition and location tests, respectively, in Swiss mice, and the pre-treatment with NPY (23,4 pmol, i.c.v.) was able to prevent those deficits induced by A β O. The Y₂ receptor activation by its agonist NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol, i.c.v.) was enough to prevent these spatial short-term memory deficits in mice in addition to prevent the ROS generation induced by A β O (0,5 μ M) *in vitro*. None of the compounds evaluated (NPY, NPY₍₁₃₋₃₆₎ and A β O) significantly altered the behavioral parameters related to emotionality evaluated in the splash and forced swim tests. At last, NPY administration damaged the olfactory discrimination in Swiss mice. The results found at the present work together with the literature support the hypothesis that NPY levels restoration and the use of Y₂ receptor agonists are potential strategies for the management of age-associated cognitive deficits as well as those present in initial stages of AD.

Keywords: Alzheimer's disease 1. Neuropeptide Y 2. Y₂ Receptor. 3. Aging. 4.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 DESENHO EXPERIMENTAL USADO PARA AVALIAR OS EFEITOS DO NPY SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS ASSOCIADAS AO ENVELHECIMENTO.	36
FIGURA 2. DESENHO EXPERIMENTAL USADO PARA AVALIAR OS EFEITOS DO NPY E DO AGONISTA DO RECEPTOR Y_2 , $NPY_{(13-36)}$ SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS POR OLIGÔMEROS DE B-AMILÓIDE.	37
FIGURA 3. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO TRATAMENTO COM NPY SOBRE A LOCOMOÇÃO.	48
FIGURA 4. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO TRATAMENTO COM NPY SOBRE A MEMÓRIA ESPACIAL.	50
FIGURA 5. AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS APÓS OS TRATAMENTOS COM PBS, NPY OU $NPY_{(13-36)}$ E COM VEÍCULO OU ABO.	52
FIGURA 6. EFEITOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS COM NPY OU $NPY_{(13-36)}$ E DA INJEÇÃO COM ABO SOBRE PARÂMETROS LOCOMOTORES.	54
FIGURA 7. EFEITOS DO FATOR DE REPETIÇÃO NO TESTE DO CAMPO ABERTO SOBRE PARÂMETROS LOCOMOTORES.	56
FIGURA 8. EFEITOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS COM NPY OU $NPY_{(13-36)}$ E DA INJEÇÃO COM ABO SOBRE A MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE CURTO PRAZO.	58
FIGURA 9. EFEITOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS COM NPY OU $NPY_{(13-36)}$ E DA INJEÇÃO COM ABO SOBRE A MEMÓRIA ESPACIAL DE CURTO PRAZO.	60
FIGURA 10. EFEITOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS COM NPY OU $NPY_{(13-36)}$ E DA INJEÇÃO COM ABO SOBRE O APRENDIZADO E MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGO PRAZO.	62
FIGURA 11. EFEITOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS COM NPY OU $NPY_{(13-36)}$ E DA INJEÇÃO COM ABO SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO ANEDÔNICO/APÁTICO.	64
FIGURA 12. EFEITOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS COM NPY OU $NPY_{(13-36)}$ E DA INJEÇÃO COM ABO SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO.	65
FIGURA 13. EFEITOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS COM NPY OU $NPY_{(13-36)}$ E DA INJEÇÃO COM ABO SOBRE A DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA.	67
FIGURA 14. EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM NPY OU $NPY_{(13-36)}$ SOBRE A IMUNODETECÇÃO DE GFAP E IBA-1.	69
FIGURA 15. EFEITOS DOS PRÉ-TRATAMENTOS COM NPY OU $NPY_{(13-36)}$ SOBRE A PRODUÇÃO DE ROS INDUZIDA POR ABO <i>IN VITRO</i>	71
FIGURE 16. RESUMO GRÁFICO.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A β – Peptídeo β -amilóide
A β ₁₋₄₀ – Peptídeo β -amilóide com 40 aminoácidos
A β ₁₋₄₂ – Peptídeo β -amilóide com 42 aminoácidos
A β O – Oligômeros de β -amilóide
AD – *Alzheimer's disease*
ADDLs – Ligantes difusíveis derivados de β -amilóide (do inglês, *A β derived diffusible ligands*)
APP – Proteína precursora amilóide, (do inglês, *Amyloid Precursor Protein*)
DA – Doença de Alzheimer
DIC – Contraste de interferência diferencial (do inglês, *differential interference contrast*)
eDA – Doença de Alzheimer esporádica
EPM – Erro padrão da média
fDA – Doença de Alzheimer familiar
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GFAP – Proteína acídica fibrilar glial (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*)
IBA-1 – molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (do inglês, *ionized calcium binding-adaptor molecule 1*)
I.c.v. – Intracerebroventricular
NMDA – N-metil D-aspartato
NMDAR – Receptor N-metil D-aspartato
NPY – Neuropeptídeo Y
NPY₍₁₃₋₃₆₎ – Porção do neuropeptídeo Y do aminoácido 13 ao 36
PBS – Tampão salino-fosfato (do inglês, *phosphate-buffered saline*)
RIPA – Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (do inglês, *radioimmunoprecipitation assay buffer*)
ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. ENVELHECIMENTO	21
1.2. A DOENÇA DE ALZHEIMER	22
1.2.1. A HIPÓTESE DA CASCATA AMILOIDE NA DOENÇA DE ALZHEIMER	24
1.2.2. A HIPÓTESE DOS OLIGÔMEROS DE AB NA DOENÇA DE ALZHEIMER	26
1.3. NEUROPEPTÍDEO Y	27
1.3.1. O NEUROPEPTÍDEO Y E O ENVELHECIMENTO	28
1.3.2. O NEUROPEPTÍDEO Y E A DA	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. OBJETIVO GERAL	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. SOLUÇÕES.....	33
3.2. ANIMAIS	33
3.3. INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR	34
3.4. EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS	35
3.4.1. CAMPO ABERTO.....	38
3.4.2. RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	38
3.4.3. LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS	39
3.4.4. LABIRINTO AQUÁTICO	40
3.4.5. DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA	41
3.4.6. SPLASH.....	42
3.4.7. NADO FORÇADO.....	42
3.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	43
3.5.1. IMUNOQUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	43
3.5.2. QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (<i>IN VITRO</i>)	44
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
4. RESULTADOS.....	47

4.1. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO TRATAMENTO COM NEUROPEPTÍDEO Y SOBRE PARÂMETROS LOCOMOTORES E COGNITIVOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6.....	47
4.1.1. PARÂMETROS LOCOMOTORES.....	47
4.1.2. PARÂMETROS COGNITIVOS.....	49
4.2. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NPY E NPY₍₁₃₋₃₆₎ SOBRE OS PREJUÍZOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS POR OLIGÔMEROS DE B-AMILÓIDE	51
4.2.1. PESO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS MACHOS	51
4.2.2. LOCOMOÇÃO.....	53
4.2.3. MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE CURTO PRAZO	57
4.2.4. MEMÓRIA ESPACIAL DE CURTO E LONGO PRAZO	59
4.2.5. COMPORTAMENTOS EMOCIONAIS	63
4.2.6. DISCRIMINAÇÃO OLFATÓRIA	66
4.2.7. QUANTIDADE RELATIVA DE IBA-1 E GFAP NO HIPOCAMPO	68
4.2.8. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) <i>IN VITRO</i>	70
<u>5. DISCUSSÃO</u>	<u>73</u>
<u>6. CONCLUSÃO</u>	<u>83</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>87</u>
<u>ANEXO A</u>	<u>98</u>

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENVELHECIMENTO

A Organização das Nações Unidas lançou um relatório em 2013 com dados de extrema relevância sobre o envelhecimento da população mundial (UNITED NATIONS 2013). Ele mostra que o envelhecimento está ocorrendo praticamente em todos os lugares do globo como resultado do processo de diminuição da mortalidade e da fertilidade. Esse processo leva à uma diminuição da parcela da população formada por crianças e o aumento da parcela formada por adultos em idade de trabalho e idosos. Dois terços da população idosa mundial (60 anos ou mais) atualmente está concentrada em países em desenvolvimento, como o Brasil, e nesses países o crescimento dessa população é maior que nos países desenvolvidos. Isso tem consequências econômicas que não podem ser ignoradas, o número de adultos em idade de trabalho por idosos está caindo, o que aumenta as pressões fiscais e nos sistemas de suporte aos idosos (que incluem a previdência social e saúde pública). Além disso, justamente nesses países em desenvolvimento, uma parcela grande dos idosos encontram-se na pobreza e se veem obrigados a trabalhar por mais tempo, muitas vezes mesmo com a saúde debilitada (IBIDEM).

Portanto, se torna cada vez mais importante investimentos que promovam a melhoria da qualidade de vida dos idosos, possibilitando-os viver de forma independente e saudável (DUNCAN et al. 2012). A ciência vem tentando ampliar o conhecimento acerca do envelhecimento, buscando padrões, marcadores e principalmente alvos terapêuticos que possam minimizar ou retardar os comprometimentos em diversas funções (cognitivas e motoras) observados com o envelhecimento. Neste sentido, melhorar a saúde e a vitalidade da população idosa, aumentar sua longevidade, diminuir a propensão a doenças, melhorar seu desempenho físico e cognitivo são os principais objetivos (BOWLING; DIEPPE 2005).

O envelhecimento pode ser caracterizado por uma perda da integridade fisiológica progressiva, acumulada durante e dependente da passagem do tempo. Ele afeta a maioria dos seres vivos, levando a uma funcionalidade prejudicada e ao aumento da vulnerabilidade a morte (LÓPEZ-OTÍN et al. 2013). Algumas alterações foram recentemente propostas como pilares do envelhecimento, elas estão presentes no envelhecimento normal e seu agravamento ou melhora experimental causa a diminuição e aumento da longevidade, respectivamente. Esses

pilares são: instabilidade genética, desgaste dos telômeros, alterações epigenéticas, perda da homeostase proteica (proteostase), sensibilidade a nutrientes desregulada, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e comunicação intercelular alterada (IBIDEM).

Os mesmos autores propõem que os pilares se relacionam entre si. Alguns são primários (instabilidade genética, desgaste dos telômeros, alterações epigenéticas, proteostase defeituosa), causados por danos acumulados progressivamente pelo tempo. Eles provavelmente promovem ou aceleram os pilares secundários (antagonistas), que inicialmente são benéficos ou protetores, mas se tornam prejudiciais quando exacerbados ou crônicos (senescência, sensibilidade a nutrientes, produção de espécies reativas de oxigênio). E por fim, os pilares integrativos (exaustão de células-tronco e alterações nas comunicações intercelulares) aparecem quando os mecanismos compensatórios teciduais não conseguem lidar mais com todo o dano gerado pelos pilares primários e secundários, afetando a homeostase e função tecidual permanentemente.

Em relação ao sistema nervoso central (SNC), esses pilares também podem ser observados, sendo que o envelhecimento causa perda de sinapses, maior propensão a neuroinflamação e neurodegeneração, diminuição de neurogênese e ultimamente o detectável declínio cognitivo e perda motora associados (para revisão ver AZPURUA; EATON 2015 e BRICKMAN; STERN 2009 e KUMAR 2015 e PETERS 2006). Portanto, é normal durante envelhecimento o indivíduo sofrer de um declínio cognitivo leve, insuficiente para interferir nas atividades do dia-a-dia. Em casos patológicos, há um declínio cognitivo intenso, com demência, em que a pessoa perde sua independência nas atividades cotidianas. A demência pode ser definida como uma desordem neurocognitiva e sua maior causa é a doença de Alzheimer (DA), estima-se que ela seja a causadora em 60 a 80% dos casos. A DA está intimamente relacionada ao envelhecimento, sendo a idade o seu principal fator de risco (ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2015).

1.2. A DOENÇA DE ALZHEIMER

A primeira descrição do quadro de uma paciente com DA e da histopatologia cerebral (com a primeira descrição de emaranhados neurofibrilares) foi feita há mais de 100 anos pelo médico alemão Alois Alzheimer (ALZHEIMER 1907 apud STELZMANN et al. 1995). A paciente de apenas 51 anos de idade, Auguste Deter, apresentava sérios

prejuízos de memória, confusão, distúrbios de humor e personalidade. Ela faleceu após quatro anos e meio do início dos sintomas, em um quadro de completa dependência dos cuidadores. Posteriormente, seu cérebro foi novamente analisado, e constatou-se que a causa para o início prematuro da DA nessa paciente foi uma mutação no gene PSEN1 (MULLER et al. 2013). A DA afeta uma em cada nove pessoas com idade superior a 65 anos, chegando a um terço da população acima de 85 anos no EUA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2015). Ela geralmente começa com uma dificuldade de recordação de informações recentes, gradualmente os sintomas vão se agravando, levando a uma perda da memória que impede a vida normal, confusão, dificuldade na fala e na escrita, mudanças de humor, apatia e depressão. Os pacientes passam a necessitar de ajuda para suas atividades diárias mais simples, passam a ter dificuldade de movimento, não reconhecem seus familiares, têm um aumento da propensão a infecções, e finalmente, vêm a óbito (IBIDEM).

Algumas mudanças no cérebro são características nos pacientes com a DA: o acúmulo da proteína β -amilóide ($A\beta$) extracelular (placas senis) e a formação anormal hiperfosforilada da proteína tau intracelular (emaranhados neurofibrilares). Além disso, há uma atrofia do parênquima cerebral, com perda sináptica e morte neuronal (IBIDEM). As alterações cerebrais podem se iniciar muitos anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas, os danos são progressivos e a velocidade de progressão varia muito de paciente para paciente (ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2015 e WOOK YOO et al. 2015).

O tratamento farmacológico disponível atualmente é baseado em dois mecanismos principais complementares:

I. Inibição das enzimas colinesterases. Essas enzimas degradam a acetilcolina nas fendas sinápticas. Os níveis desse importante neurotransmissor encontram-se reduzidos na DA e o bloqueio dessas enzimas aumenta a disponibilidade de acetilcolina, restaurando-a aos níveis normais e melhorando a memória e a cognição dos pacientes (PARSONS et al. 2013). Existem quatro fármacos aprovados pela ANVISA que atuam através deste mecanismo: tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina (ENGELHARDT et al. 2005).

II. Antagonismo dos receptores N-metil D-aspartato (NMDARs). A ativação desses receptores ionotrópicos excitatórios para o glutamato é muito importante para o aprendizado e a memória, porém na DA eles estão constantemente superativados, levando a um influxo continuado de cálcio nos neurônios pós-sinápticos. Este acúmulo de cálcio nos neurônios leva a um fenômeno chamado de excitotoxicidade, sendo este um dos principais mecanismos de morte neuronal na DA. A memantina

representa o único fármaco aprovado pela ANVISA que atua como antagonista não-competitivo dos NMDARs (ENGELHARDT et al. 2005). A memantina apresenta afinidade moderada pelos NMDARs, permitindo a ativação destes receptores em condições fisiológicas e impedindo a sua superativação na DA, normalizando assim a neurotransmissão glutamatérgica disfuncional e melhorando a função cognitiva dos pacientes (PARSONS et al. 2013).

Além dos fármacos citados acima, destinados ao tratamento paliativo dos sintomas cognitivos, frequentemente são associados fármacos para o tratamento dos transtornos de humor, os mais indicados são os inibidores da receptação de serotonina para controle da depressão e neurolépticos, típicos ou atípicos, para o tratamento da agitação e manifestações psicóticas (ENGELHARDT et al. 2005). Também podem ser associadas outros tipos de terapia, como treinamento cognitivo e exercícios físicos (IBIDEM). No entanto, os tratamentos atualmente disponíveis não são capazes de reverter a perda cognitiva presente, ou ao menos frear a progressão da doença (BOND et al. 2012 e (ENGELHARDT et al. 2005). Por isso, é de suma importância pesquisas que visem melhor conhecer a fisiopatologia da DA e a descoberta de novos alvos e agentes terapêuticos.

1.2.1. A hipótese da cascata amiloide na doença de Alzheimer

A hipótese da cascata amiloide, primeiramente elaborada na década de 1990, propõe que a deposição da proteína β -amilóide (principal componente das placas senis) seria o agente causador da DA. Os demais fenômenos observados na doença, emaranhados neurofibrilares, perda celular, dano vascular e demência, representariam consequências diretas dessa deposição (HARDY; HIGGINS 1992). Essa hipótese é fortemente baseada nas mutações genéticas associadas a forma familiar da DA (fDA), presentes no gene que codifica a proteína precursora amilóide (APP) e nos genes codificantes das enzimas presenilina 1 (PSEN1) e 2 (PSEN2), as mutações de seus genes levam ao acúmulo acelerado de $A\beta$ e ao aparecimento precoce da DA, da angiopatia amiloide cerebral ou ambas (HARDY; HIGGINS 1992 e MUSIEK; HOLTZMAN 2015).

A APP é uma proteína transmembrana que pode ser processada por duas vias distintas, a via não-amiloidogênica e a amiloidogênica (HARDY; HIGGINS 1992). Na primeira, ela é clivada por enzimas α -secretase formando um fragmento N-terminal e um C-terminal a ser

clivado por enzimas γ -secretase. A clivagem da APP pelas α -secretase acontece em um sítio contido no peptídeo A β , portanto, impede sua formação. Já na via amiloidogênica, a APP é clivada por enzimas β -secretase gerando um fragmento C-terminal posteriormente clivado pelas enzimas γ -secretase, assim formando o peptídeo A β liberado para o meio extracelular (para revisão ver PAULA; GUIMARÃES 2009).

Porém, a forma mais frequente da DA é a esporádica (eDA), associada ao envelhecimento. Nessa forma, as evidências de que os agregados de A β sejam causadores ou sequer necessários para a patologia são menos claras (HERRUP 2015 e MUSIEK; HOLTZMAN 2015). Atualmente, é sabido que a distribuição dos agregados de A β não se correlaciona com as áreas de início da neurodegeneração e do aparecimento dos emaranhados neurofibrilares. Além disso, há também uma discordância temporal entre o aparecimento das placas senis e dos sintomas, havendo muitos pacientes com a patologia amiloide assintomática, i.e., sem demência. Por esses motivos, a hipótese amiloide vem sendo criticada (HERRUP 2015).

Na tentativa de acomodar as descobertas científicas mais recentes, a hipótese da cascata amiloide na DA foi revisitada. No novo modelo proposto pelos autores, a produção e os níveis de A β são controlados durante a vida, garantindo a homeostase. Porém, alguns fatores cumulativos ao longo da vida, como perturbações do sono, estresse psicológico, propensão genética, isquemia, diminuição do *clearance* do A β relacionado ao envelhecimento, dentre outros, podem perturbar esse fino balanço facilitando o acúmulo de A β e o aparecimento de espécies oligoméricas e fibrilares desse peptídeo (MUSIEK; HOLTZMAN 2015).

As placas senis, marcos histopatológicos da doença, podem aparecer muitos anos antes dos sintomas. Nesse modelo, de alguma forma, essas espécies de A β aceleram a patologia tau, com a hiperfosforilação dessa proteína, e facilitam que os emaranhados neurofibrilares se distribuam do sistema límbico para o neocórtex cerebral, aumentando a neurodegeneração. Finalmente, a capacidade proteostática do SNC é superada e ocorre a agregação e acúmulo de diversas proteínas, como a α -sinucleína. Como consequência da cascata A β ocorrem perda neuronal, dano oxidativo, inflamação e o aparecimento dos sintomas clínicos. Neste ponto, não é esperado que a remoção de A β tenha um grande impacto sobre os sintomas e prognóstico do paciente, pois os danos já existentes são capazes de se manterem e progredirem, aumentando a morte neuronal (IBIDEM).

1.2.2.A hipótese dos oligômeros de A β na doença de Alzheimer

Achados mais recentes em animais transgênicos e pacientes vêm trazendo uma mudança importante na maneira como vemos o início da DA: os oligômeros de β -amilóide (A β O) ou ligantes difusíveis derivados de β -amilóide (ADDLs) parecem representar os agentes tóxicos primários nesta doença, e não as fibrilas e agregados maiores insolúveis como se acreditava inicialmente (FERREIRA; KLEIN 2011 e FERREIRA et al. 2015). A hipótese dos A β O propõe que os primeiros sintomas cognitivos da doença estão associados a perdas sinápticas provocadas pelo ataque direto dos A β O. Essas pequenas toxinas também iniciam complexas sinalizações intracelulares que culminam com a morte neuronal observada em fases mais avançadas da doença (FERREIRA; KLEIN 2011 e FERREIRA et al. 2015 e LAMBERT et al. 1998).

Os A β O, por serem solúveis e relativamente pequenos, são capazes de trafegar pelo parênquima cerebral, atingindo locais distantes daqueles onde se concentram as placas senis e, sendo assim, potencialmente mais tóxicos (HAASS; SELKOE 2007). Eles são capazes de chegar até as sinapses, seus principais alvos, atacando-as. Além disso, eles podem ser encontrados no sistema límbico junto aos primeiros emaranhados neurofibrilares. Os A β O podem ser o elo faltante entre a patologia amiloide, disfunção sináptica e o início das alterações na proteína tau (para revisão ver FERREIRA; KLEIN 2011 e FERREIRA et al. 2015 e MUSIEK; HOLTZMAN 2015). Corroborando essa hipótese, os níveis de A β solúveis são capazes de diferenciar os pacientes com DA dos idosos normais e dos sem demência porém com patologia amiloide, e são melhores associados à perda sináptica e densidade de emaranhados neurofibrilares que a porção insolúvel desse peptídeo (LUE et al. 1999 e MCLEAN CA et al. 1999).

Amiloide é um conceito genérico para depósitos teciduais fibrilares insolúveis, ricos em estruturas de folhas- β , e que se ligam a corantes como o *Congo Red* ou tioflavina T de uma maneira polarizada (HAASS; SELKOE 2007). No caso da DA, os amiloides são formados pelo peptídeo A β , mas em outras doenças são formados por outras proteínas, como na doença de Parkinson, onde são formados por α -sinucleína. A hipótese oligomérica, portanto, não é amiloide. Nessa hipótese, os amiloides agem apenas como depósitos dos verdadeiros

agentes tóxicos, os A β O (FERREIRA; KLEIN 2011 e HAASS; SELKOE 2007).

Baseando-se nessa hipótese, foi desenvolvido um modelo de injeção intracerebroventricular (i.c.v.) com os A β O no cérebro de camundongos. Esse modelo agudo mimetiza a fase inicial sintomática da DA esporádica. Como já descrito na literatura (FERREIRA; KLEIN 2011 e FERREIRA et al. 2015 e FIGUEIREDO et al. 2013 e LEDO et al. 2013), os A β O são capazes de gerar prejuízos cognitivos em roedores semelhantes aos observados nos pacientes em fases iniciais da DA, quando há perda sináptica, início dos sintomas cognitivos mas ainda não há morte celular ostensiva. Esses prejuízos podem estar associados à perda sináptica e à indução de um quadro neuroinflamatório, com recrutamento de células da glia e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (LEDO et al. 2013). Além disso, foi mostrado recentemente que a injeção de A β O no ventrículo lateral de primatas também é capaz de induzir uma patologia semelhante a DA, com perda sináptica, ativação astrocitária e microglial, e também hiperfosforilação da proteína tau e a formação de emaranhados neurofibrilares, marco histopatológico da DA (FORNY-GERMANO et al. 2014).

1.3. NEUROPEPTÍDEO Y

O neuropeptídeo Y (NPY) foi primeiramente isolado na década de 1980 (TATEMOTO 1982 e TATEMOTO et al. 1982), sendo o neurotransmissor peptídico mais abundante no SNC e sistema nervoso periférico (SNP). Ele pertence à família de polipeptídeos pancreáticos juntamente ao polipeptídeo pancreático e ao peptídeo YY, todos com 36 aminoácidos e região C-terminal aminada (MICHEL et al. 1998). Além disso, eles compartilham a estrutura tridimensional de um grampo (*PP-fold*) (DARBON et al. 1992). Essa família de peptídeos exerce suas ações através de receptores acoplados à proteína G (G_i ou G_o). Os cinco receptores para o NPY identificados e clonados até o momento são simbolizados pela letra Y: Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 e y_6 . O gene do receptor y_6 é truncado em primatas, não funcional, por isso recebe a letra minúscula (MICHEL et al. 1998). O NPY possui afinidade alta pelos receptores Y_1 , Y_2 e Y_5 e baixíssima pelo receptor Y_4 (KEIRE et al. 2002).

A expressão dos subtipos de receptores Y_1 , Y_4 e Y_5 no cérebro humano, ao contrário de em ratos, é muito baixa, sendo mais proeminente no giro denteado do hipocampo. Já a expressão do subtipo Y_2 é abundante, sendo mais expresso no córtex, hipocampo e

hipotálamo em humanos (DUMONT et al. 1998). Esse subtipo de receptor, Y_2 , age como um auto-receptor, sendo co-expresso com o NPY em neurônios (CABERLOTTO et al. 2000). Ele tem grande importância no controle da excitabilidade no hipocampo (COLMERS et al. 1991), através da diminuição da liberação de glutamato (GREBER et al. 1994 e SILVA et al. 2001), e está envolvido na formação da memória (REDROBE et al. 2004).

O NPY está presente abundantemente principalmente no neocórtex, no hipocampo, no hipotálamo, nos gânglios da base e na amígdala no cérebro humano (ADRIAN et al. 1983 e CABERLOTTO et al. 2000). Em condições fisiológicas, o NPY está co-localizado em neurônios que produzem outros neurotransmissores, como o ácido gama-amino-butírico (GABA), catecolaminas e a somatostatina, e também de moléculas sinalizadoras, como o óxido nítrico (para revisão ver AOKI; PICKEL 1990). Suas ações podem levar de minutos ou dias após a ativação dos seus receptores, por esta razão, as ações do NPY tendem a ser de um controle mais fino, modulando as transmissões de outros neurotransmissores, neuromoduladores ou até de hormônios (VAN DEN POL 2012).

A função fisiológica mais conhecida do NPY é no controle do apetite, sendo um orexígeno frequentemente citado com alvo para terapias para obesidade e anorexia (para revisão ver YULYANINGSIH et al. 2011). Além dessa, diversas funções para o NPY já foram descritas na literatura, podemos ressaltar seu envolvimento na memória (FLOOD et al. 1987, 1989), na promoção da neurogênese (DECRESSAC et al. 2009 e HANSEL et al. 2001 e HOWELL et al. 2005), na neuroproteção a excitotoxicidade (SILVA et al. 2003), como ansiolítico (HEILIG et al. 1989) e na modulação da inflamação (FERREIRA et al. 2010, 2011), para revisão ver DECRESSAC; BARKER 2012 e MALVA et al. 2012.

1.3.1. O Neuropeptídeo Y e o envelhecimento

O envelhecimento é capaz de mudar a expressão do NPY e de seus receptores, diminuindo de maneira geral as densidades do peptídeo e dos subtipos de seus receptores em várias regiões do cérebro, como o hipocampo, estriado, tálamo e hipotálamo em ratos (HIGUCHI et al. 1988 e VEYRAT-DUREBEX et al. 2013). Além disso, a restrição calórica, sabidamente neuroprotetora durante o envelhecimento, também é capaz de mudar o padrão de expressão desses receptores no cérebro de ratos idosos. Ela leva a uma diminuição da densidade de receptores Y_1 no giro denteado, núcleos talâmicos e hipotalâmicos e na área

hipotalâmica lateral, e de receptores Y_2 no núcleo supraquiasmático do hipotálamo. Ao mesmo tempo, aumenta a densidade do receptor Y_2 na região CA2 do hipocampo e previne o aumento do receptor Y_1 no núcleo ventromedial hipotalâmico induzido pela idade (VEYRAT-DUREBEX et al. 2013). Dados recentes indicam que o NPY pode induzir autofagia no hipotálamo. Esse importante mecanismo, desbalanceado durante o processo de envelhecimento, e que também pode ser induzido pela restrição calórica, encontra-se diminuído nessa estrutura com o avanço da idade (AVELEIRA; BOTELHO; CARMO-SILVA; et al. 2015).

Esses dados, em conjunto com as funções fisiológicas conhecidas do NPY citadas anteriormente, sugerem que as vias desse neuropeptídeo podem representar bons alvos para terapias antienvhecimento (AVELEIRA; BOTELHO; CAVADAS 2015 e BOTELHO; CAVADAS 2015).

1.3.2. O Neuropeptídeo Y e a DA

Diversos trabalhos na literatura mostram um desequilíbrio nas vias neuronais do NPY em pacientes com a DA. Foi mostrado uma diminuição nos níveis deste neuropeptídeo no líquido cefalorraquiano de pacientes com a DA (MARTIGNONI et al. 1992). Há também uma diminuição nas populações neuronais que expressam o NPY no córtex e hipocampo de pacientes com DA (CHAN-PALAY et al. 1985, 1986). A densidade de receptores para o NPY também parece estar diminuída nessa doença (MARTEL et al. 1990). Além disso, foi mostrado que a perda dos neurônios que expressam o NPY é precoce e preferencial em um modelo transgênico da DA (RAMOS et al. 2006). Esses dados sugerem que a perda das vias do NPY pode ser um passo importante e inicial na patologia da DA.

Do ponto de vista de mecanismos, o NPY é capaz de inibir a liberação de glutamato via ativação dos receptores pré-sinápticos Y_2 (GREBER et al. 1994 e SILVA et al. 2001). O NPY exerce efeitos neuroprotetores em diversos modelos de excitotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, (DOMIN et al. 2006 e SILVA et al. 2003 e ŚMIAŁOWSKA et al. 2009) Além disso, ele também é capaz de promover a liberação de neurotrofinas em modelos da DA *in vitro* (CROCE et al. 2011, 2012, 2013). Em modelos transgênicos da DA, foi mostrado que a aplicação de fragmentos do NPY, resultantes do processamento por uma enzima que também degrada $A\beta$ (nepirilina), diminui a neurodegeneração associada a essa patologia (ROSE et al. 2009). Em um trabalho mais recente do

nosso grupo, foi mostrado que a injeção i.c.v. com NPY previne os prejuízos cognitivos e emocionais induzidos pela administração de agregados da proteína em camundongos. Nesse trabalho também foi mostrado que a ativação dos receptores Y_2 é necessária para que ocorram os efeitos neuroprotetores do NPY (SANTOS et al. 2013).

Diante do exposto, a hipótese desse trabalho é que o NPY é capaz de melhorar os prejuízos comportamentais e neuroquímicos associados ao envelhecimento e a doença de Alzheimer via ativação dos receptores Y_2 . No presente estudo buscou-se aprofundar o conhecimento acerca dos efeitos neuroprotetores do NPY no envelhecimento e na fase inicial da DA, e também confirmar o potencial terapêutico dos receptores Y_2 nessa doença. Para isso, investigamos os efeitos da administração i.c.v. de NPY em camundongos envelhecidos (11 meses de idade) da linhagem C57BL/6, bem como da administração i.c.v. de NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎, um agonista dos receptores Y_2 , sobre os prejuízos comportamentais e neuroquímicos induzidos pela subsequente administração i.c.v. de A β O em camundongos suíços.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar os efeitos da administração i.c.v. do NPY e da ativação seletiva dos receptores Y_2 sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas associadas ao envelhecimento e induzidos pela administração com A β O em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar os efeitos do envelhecimento e da administração i.c.v. de NPY sobre a locomoção e a memória espacial de curto prazo de camundongos da linhagem C57BL/6 com 2 e 11 meses de idade nos testes do campo aberto e localização de objetos.
- II. Analisar os efeitos do pré-tratamento i.c.v. de camundongos suíços adultos com PBS, NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (agonista do receptor Y_2) sobre as possíveis alterações sensoriais, cognitivas e motoras induzidas por A β O através do uso dos testes do campo aberto (locomoção), reconhecimento e localização de objetos (memória de curto prazo), labirinto aquático (memória espacial de longo prazo), *splash test* e nado forçado (anedonia e depressão), e discriminação olfatória (olfação).
- III. Mensurar os efeitos do pré-tratamento com PBS, NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e da injeção i.c.v. com A β O sobre a astrogliose e microgliose no hipocampo de camundongos suíços adultos através da quantificação dos níveis das proteínas GFAP e IBA-1 usando a técnica de *western-blot*.
- IV. Determinar o efeito do pré-tratamento com PBS, NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (agonista do receptor Y_2) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por A β O em cultura primária de neurônios do hipocampo de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SOLUÇÕES

Tampão salino-fosfato (PBS) contendo 137 mM de cloreto de sódio, 10 mM de fosfato, 2,7 mM de cloreto de potássio e pH 7,4. Neuropeptídeo Y (NPY), (Tocris Bioscience, Reino Unido), foi dissolvido a 78 μ M em PBS em pH 7,4. O agonista do receptor Y_2 , Neuropeptídeo Y 13-36 (NPY₍₁₃₋₃₆₎) porcino (Tocris Bioscience), foi dissolvido a 100 μ M em PBS em pH 7,4. O NPY₍₁₃₋₃₆₎ porcino possui alta afinidade pelos receptores Y_2 e baixa afinidade pelos receptores Y_1 , Y_4 e Y_5 em roedores na seguinte ordem: $Y_2 > Y_5 \gg Y_1 > Y_4$ (KEIRE et al. 2002 e PARKER; BALASUBRAMANIAM 2008 e PATEL; PATEL 2009). Portanto, nas concentrações utilizadas desse agonista no presente estudo, a ativação dos receptores Y_1 e Y_4 pode ser considerada como inexistente e dos receptores Y_5 como mínima. As soluções foram alíquotadas e armazenadas a -20 °C até o uso, sendo então mantidas a 4 °C.

Os oligômeros de β -amilóide (A β O) foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Sérgio Teixeira Ferreira (Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Brasil). Foram produzidos à partir do peptídeo sintético A β ₁₋₄₂ (American Peptide, EUA) conforme descrito anteriormente por LAMBERT et al., 1998 e mais recentemente por FIGUEIREDO et al., 2013. As preparações são rotineiramente validadas pelo mesmo laboratório por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão de tamanho e ocasionalmente por *western-blot* usando anticorpos específicos para oligômeros de β -amilóide.

Apenas preparações com boa qualidade e perfis cromatográficos dentro do esperado foram utilizadas. O anexo A exemplifica o perfil cromatográfico obtido através de uma das preparações utilizadas para esse trabalho. Uma vez produzidos, os oligômeros foram conservados a 4 °C e utilizados dentro do prazo de 72 horas. A solução veículo foi preparada de maneira idêntica a dos A β O, porém, sem adição dos peptídeos A β ₁₋₄₂, com isso, ela é formada majoritariamente por PBS e níveis mínimos de DMSO.

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados 60 camundongos suíços machos com 3 meses de idade provenientes da Faculdade de Farmácia da Universidade do Rio de

Janeiro (Brasil) e da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), e, 10 camundongos C57BL/6 machos com 2 meses de idade e nove camundongos C57BL/6 com 11 meses de idade provenientes da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em mini-isoladoras de 37,9 cm (comprimento) x 19,7 cm (largura) x 12,7 cm (altura), em grupos de três a cinco animais por gaiola, em prateleiras ventiladas com temperaturas mantidas a 23 ± 2 °C, sob um ciclo de claro/escuro de 12 h. Os animais tinham acesso irrestrito a ração e água.

Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelos respectivos comitês de ética e uso de animais, na Universidade Federal de Santa Catarina sob o número de protocolo PP00830 e no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número 049/14.

3.3. INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR

A injeção i.c.v. em camundongos foi originalmente descrita por HALEY; MCCORMICK, 1957 e posteriormente modificada por LAURSEN; BELKNAP, 1986. Brevemente, os animais foram anestesiados usando um sistema de vaporização com fornecimento de oxigênio constante e 2,5% de isoflurano (Cristália, Brasil). Uma vez anestesiados, os animais foram imobilizados e tiveram sua pele da cabeça gentilmente esticada na direção posterior. As injeções foram realizadas cerca de 1 mm lateralmente do ponto equidistante dos dois olhos e cerca de 0,1 mm posterior da linha imaginária desenhada do ponto mais posterior dos olhos. Foram utilizadas agulhas gengivais 30-G cortadas com 3 mm de comprimento acopladas a uma seringa Hamilton de 10 µl.

As injeções foram realizadas por um pesquisador treinado que obteve mais de 85% de sucesso em treinamento feito com corante azul nos mesmos locais alvo das injeções deste experimento a fim de averiguar a acurácia das mesmas no ventrículo lateral. Cada animal recebeu 2 µl de solução de acordo com o protocolo utilizado.

Para avaliar os efeitos do NPY sobre o envelhecimento, 10 camundongos C57BL/6 machos com 2 meses e nove camundongos com 11 meses de idade receberam 23,4 pmol NPY (11,7 µM). Para avaliar os efeitos do NPY e do NPY₍₁₃₋₃₆₎ sobre a toxicidade induzida por AβO, os camundongos suíços machos receberam duas injeções i.c.v. contralaterais. A primeira com PBS, 23,4 pmol NPY (11,7 µM) ou 23,4 pmol NPY₍₁₃₋₃₆₎ (11,7 µM). Após 15 min, os animais receberam a segunda injeção com veículo ou 10 pmol AβO (5 µM). Ao total foram

utilizados 6 grupos neste conjunto de experimentos: PBS + Veículo (12 animais), NPY + Veículo (8 animais, sendo que um faleceu por causas desconhecidas durante os experimentos), NPY₍₁₃₋₃₆₎ + Veículo (8 animais), PBS + A β O (12 animais), NPY + A β O (10 animais) e NPY₍₁₃₋₃₆₎ + A β O (10 animais).

As doses de NPY e NPY₍₁₃₋₃₆₎ foram estabelecidas baseando-se em trabalho anterior de nosso grupo (SANTOS et al. 2013) e da literatura (FLOOD et al. 1987, 1989). A dose de A β O também foi estabelecida baseando-se em trabalhos anteriores do grupo do prof. Dr. Sérgio Ferreira (UFRJ) (FIGUEIREDO et al. 2013 e LEDO et al. 2013).

3.4. EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS

Todos os experimentos foram filmados e realizados durante o ciclo claro, entre 8:00 e 18:00 h. Os animais foram habituados por pelo menos uma hora antes e mantidos em uma sala com mesmas condições de iluminação (luz fluorescente indireta) e temperatura (23 °C) da sala experimental, permanecendo na última apenas o tempo necessário para os testes. A única exceção a isso, foi para o labirinto aquático, em que os animais foram habituados e permaneceram na sala experimental durante todo o experimento. Todos os aparatos foram limpos com álcool 70% entre a avaliação de um animal e outra buscando evitar pistas olfatórias que pudessem alterar o comportamento dos animais.

Para avaliação dos efeitos do NPY sobre o envelhecimento, foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de 2 e 11 meses de idade e a sequência experimental utilizada está ilustrada na **Figura 1**. Já para avaliação dos efeitos do NPY e do NPY₍₁₃₋₃₆₎ sobre a toxicidade induzida por A β O, foram utilizados camundongos suíços machos de 3 meses de idade e a sequência experimental está representada pela **Figura 2**. Os animais foram pesados um dia antes das injeções (medida basal) e também após 24 horas, 4, 8 e 12 dias dos tratamentos. Foi calculada a diferença do peso de cada animal nos dias indicados daquele registrado na medida basal (Δ peso). A ordem dos experimentos comportamentais foi escolhida baseando-se em dois princípios: (1) referências de trabalhos anteriores do grupo, conforme o indicado nas sessões à seguir; (2) manutenção de uma ordem crescente de aversão dos procedimentos para que cada experimento influenciasse o menos possível nos seguintes.

Figura 1 Desenho experimental usado para avaliar os efeitos do NPY sobre as alterações comportamentais associadas ao envelhecimento.

Camundongos C57BL/6 machos com 2 ou 11 meses de idade foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais para avaliar suas funções motora (campo aberto) e cognitiva (localização de objetos). Em seguida, todos os animais receberam uma injeção i.c.v. com NPY (23,4 pmol). Após 5 e 6 dias do tratamento com NPY, os mesmos animais foram resubmetidos aos testes do campo aberto e localização de objetos.

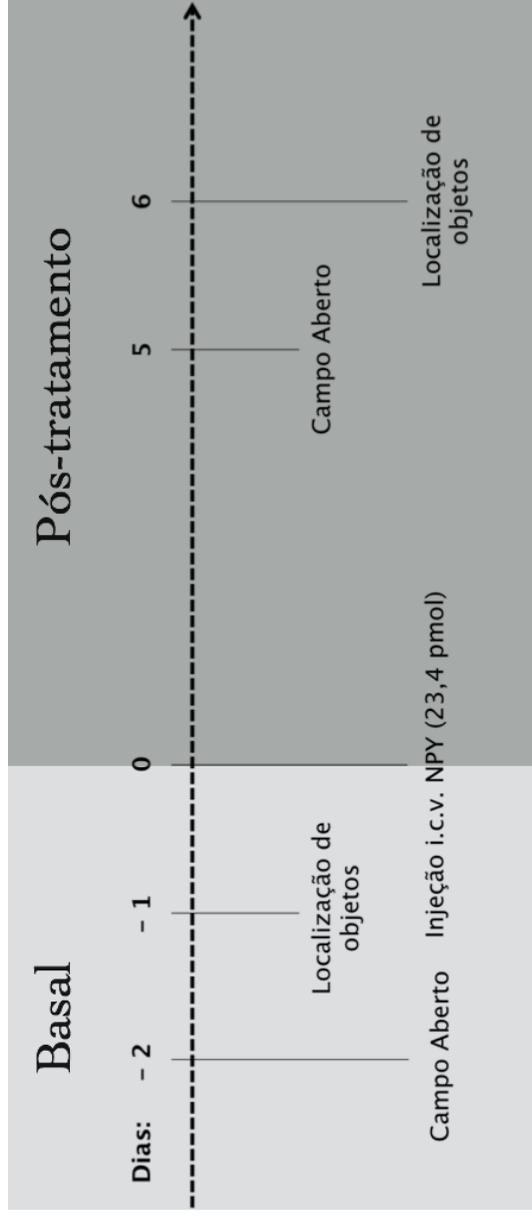
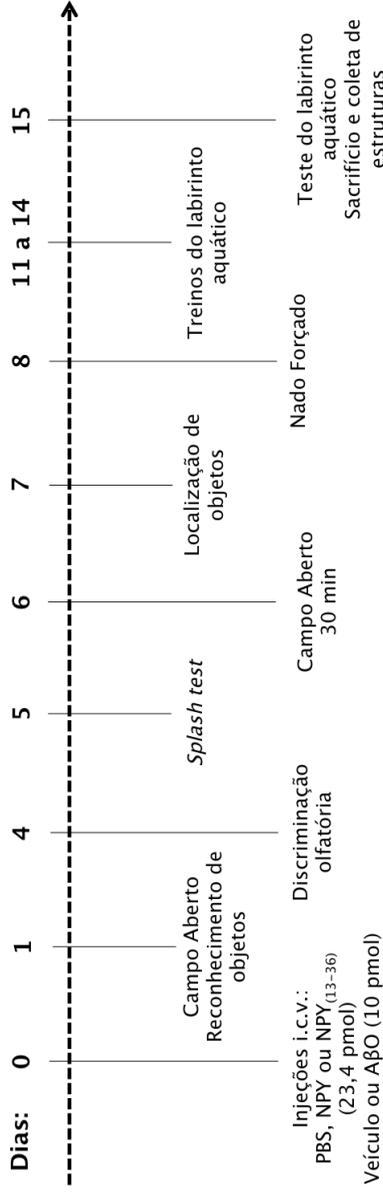


Figura 2. Desenho experimental usado para avaliar os efeitos do NPY e do agonista do receptor Y₂, NPY₍₁₃₋₃₆₎ sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por oligômeros de β -amilóide. Camundongos suíços machos com 3 meses de idade receberam uma injeção i.c.v. com PBS, NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e após 15 min receberam outra injeção i.c.v. contralateral com veículo ou A β O. Em seguida, os animais foram submetidos durante duas semanas a uma bateria de testes comportamentais, sendo então sacrificados e tiveram o hipocampo coletado para posteriores análises bioquímicas.



3.4.1. Campo Aberto

O aparato do campo aberto consiste em uma caixa de base quadrada de 30 cm de lado e 45 cm de altura, de paredes escuras e sem cobertura. Nas paredes do aparato foram coladas pistas visuais assimétricas. Para aumento do contraste e melhor captura das imagens, foi utilizado no aparato o fundo branco para os camundongos C57BL/6 e fundo preto para os camundongos suíços. Os animais foram posicionados no centro do aparato e puderam explorar livremente o mesmo durante 5 ou 30 min, conforme indicado na seção de resultados. Os parâmetros comportamentais foram analisados através do uso do *software* ANY-maze (BELZUNG 1999).

Além do parâmetro de locomoção (distância percorrida), foi também medido um parâmetro relacionado a ansiedade (tempo no centro). O fundo do aparato pode ser subdividido imaginariamente em nove quadrantes de 10 cm de lado, (um central e oito periféricos). É da natureza dos roedores preferir se locomover pela periferia, próximo as paredes (tigmotactismo), evitando o centro do aparato. Portanto, um aumento no tempo gasto no quadrante central pode ser um indicativo de uma diminuição do comportamento ansioso normal, da mesma forma, uma diminuição deste tempo pode estar relacionada a ansiogênese (PRUT; BELZUNG 2003).

Além de servir para análise de parâmetros locomotores e de ansiedade, o teste de campo aberto tem ainda a função de habituação para os testes de localização e reconhecimento de objetos subsequentes, já que estes são realizados no mesmo aparato. Essa fase de habituação se mostrou importante para o aumento da exploração dos objetos pelos animais nos testes mencionados (LEGER et al. 2013).

3.4.2. Reconhecimento de Objetos

Esse experimento foi realizado no mesmo aparato do campo aberto, onde os animais haviam sido habituados previamente (**Figuras 1 e 2, item 3.4.1.**). Nele foram colocados dois objetos de plástico de base simétrica e idênticos, (1) e (2), dispostos cerca de 7 cm equidistantes das laterais. Os objetos foram grudados no chão com fita adesiva para que não fossem movidos durante o experimento.

Os animais foram colocados no centro do campo aberto onde puderam movimentar-se livremente durante 5 min (treino ou familiarização). O tempo que cada animal gastou investigando cada um dos objetos a um centímetro ou menos de distância foi registrado com a

ajuda de cronômetros por um observador treinado. Nesta sessão, os animais tendem a explorar os dois objetos de maneira semelhante (LEGER et al. 2013). Após 90 min, os animais foram recolocados no aparato por 5 min, porém dessa vez, um dos objetos foi substituído por outro de formato e cor diferentes mas com área de base e altura semelhantes. Novamente, o tempo de exploração de cada objeto foi registrado. A porcentagem de exploração do objeto novo (N) ou familiar (F) em relação a exploração total (N + F) foi calculada.

O teste de reconhecimento de objetos, ou reconhecimento do objeto novo, tem suas origens na década de 1980 (ENNACEUR; DELACOUR 1988) e se baseia na preferência inata dos animais pela novidade. É esperado que percebendo a diferença entre os objetos, os roedores prefiram investigar por mais tempo o objeto novo (N) em detrimento do familiar (F) (LEGER et al. 2013). Ou seja, os animais capazes de reconhecer o objeto familiar, tendem a ter uma porcentagem de exploração do objeto novo superior a 50%, que é o valor esperado para a exploração ao acaso dos dois objetos. O protocolo aqui descrito e a escolha do tempo após as injeções (24 h) foram baseados em trabalhos anteriores do nosso grupo (FIGUEIREDO et al. 2013 e LEDO et al. 2013). Os objetos já foram testados anteriormente, não tendo os animais preferência inata por nenhum deles.

3.4.3. Localização de objetos

O experimento de localização de objetos, ou realocação de objetos, é de certa forma semelhante ao de reconhecimento de objetos: se baseia no mesmo princípio de que os animais tendem a preferir a novidade e foi primeiramente descrito em ratos pelo mesmo grupo (ENNACEUR; MELIANI 1992). O protocolo aqui relatado é baseado em adaptação mais recente para camundongos (MURAI et al. 2007), o tempo após as injeções foi escolhido baseado em trabalho anterior do grupo (SANTOS et al. 2013).

O experimento foi realizado no aparato do campo aberto, onde os animais foram previamente habituados por 30 min (**figuras 1 e 2, item 3.4.1.**). Dois objetos de plástico de base simétrica e idênticos, (1) e (2), foram fixados com fita adesiva no chão do aparato. É importante frisar que os objetos utilizados nesse experimento são diferentes daqueles utilizados no teste de reconhecimento de objetos. Eles foram dispostos lateralmente nos cantos do aparato, 7 cm equidistantes das paredes.

Os animais foram colocados no centro do aparato e deixados para se movimentarem livremente por 5 min (treino ou familiarização). Após

90 min, os animais foram recolocados no aparato também por 5 min (teste). Porém, desta vez, um dos objetos fora movido para o lado oposto do aparato, (ainda a 7 cm equidistantes das paredes adjacentes), ficando na diagonal do objeto mantido na posição familiar. Em ambas as sessões o tempo que cada animal passou investigando cada objeto a menos de um centímetro de distância foi registrado com a ajuda de cronômetros por um observador treinado. No teste, o resultado é mostrado como porcentagem do tempo gasto explorando o objeto realocado (R) ou na posição familiar (F) em relação ao tempo de exploração total (R + F). Neste caso, os animais capazes de reconhecerem a mudança de posicionamento do objeto, apresentarão uma porcentagem de exploração do objeto realocado superior a 50% (valor teórico estimado para o acaso) (MURAI et al. 2007).

3.4.4. Labirinto aquático

O teste do labirinto aquático foi primeiramente descrito em ratos na década de 1980, consistindo basicamente em se colocar o animal em um grande tanque com água onde ele deve ser capaz de encontrar uma plataforma invisível baseando-se em pistas visuais distais (MORRIS 1984). Diferentes versões do teste foram padronizadas visando avaliar diferentes tipos de memória, e os procedimentos foram adaptados também para camundongos. O protocolo utilizado nesse trabalho foi baseado na versão de aprendizado e memória espacial descrita por VORHEES; WILLIAMS 2006.

A temperatura da sala e da água foram mantidas em aproximadamente 22 °C com iluminação indireta. O tanque possui fundo escuro, um metro de diâmetro e cerca de 30 cm de profundidade. A plataforma utilizada é escura, circular, com 7,5 cm de diâmetro e ficou submersa entre 0,5 e 1 cm abaixo da superfície da água, tornando-se assim invisível aos animais no mesmo plano. O aparato foi cercado por uma cortina para evitar que os animais vissem o experimentador durante os testes. Pistas visuais distais foram fixadas nas cortinas para permitir a formação de um mapa espacial. A plataforma permaneceu fixa durante todos os treinos no centro do quadrante sudoeste (quadrante-alvo), sendo retirada apenas para a sessão teste. Após os treinos e o testes, os animais foram colocados em gaiolas com maravalha seca, cobertas, sob uma luz quente para que se secassem.

O treinamento consistiu em quatro treinos consecutivos por dia durante quatro dias. Nele, os animais foram liberados no tanque voltados para a parede dos quatro pontos cardinais em uma sequência semi-

aleatória e variada ao longo dos dias: 1º dia: N, S, L e O; 2º dia: L, O, N e S; 3º dia: O, N, S e L; 4º dia: S, L, O e N. O tempo de latência para que os animais encontrassem a plataforma foi registrado com ajuda de cronômetros. Se o animal não fosse capaz de encontrar a plataforma dentro de 60 s, ele era gentilmente guiado pelo experimentador até alcançá-la. Uma vez na plataforma, os animais eram mantidos ali por 20 s antes de serem retirados. Os resultados do treinamento são representados como média dos tempos de latência dos quatro treinamentos de cada dia.

Vinte e quatro horas após o último treino, os animais foram submetidos ao teste, no qual a plataforma foi retirada e os animais foram liberados do ponto norte voltados para a parede. A distância total percorrida pelos animais e o tempo gasto no quadrante-alvo (sudoeste), onde estava a plataforma durante o treinamento, foi avaliado através do *software* ANY-maze por 60 s. Os animais capazes de se lembrar do local da plataforma tendem a passar mais tempo nesse quadrante que nos demais (MORRIS 1984 e VORHEES; WILLIAMS 2006), ou seja, permanecerão no quadrante alvo mais que 25% do tempo (valor teórico esperado para o acaso).

3.4.5. Discriminação olfatória

O teste de discriminação olfatória seguiu o protocolo para camundongos já utilizado por nosso grupo (PREDIGER et al. 2010). Essa tarefa se baseia no comportamento de roedores de preferir locais impregnados com seu próprio odor a locais com odores diferentes. O aparato utilizado é branco, de base quadrada de 50 cm de lado, e 40cm de altura. Ele é dividido em dois compartimentos retangulares iguais por uma parede de plástico transparente com um portal por onde os animais são capazes de atravessar. No compartimento familiar foi colocado um punhado de maravalha já utilizada pelos animais por quatro dias, portanto impregnada com o seu odor. No outro compartimento (não-familiar) foi colocado um punhado de maravalha limpa. A maravalha limpa foi trocada para cada animal, enquanto que a maravalha familiar foi utilizada por todos os animais que estavam na mesma gaiola.

Os animais foram liberados no compartimento não-familiar, voltados para o familiar, e seu comportamento exploratório foi avaliado por 5 min. O tempo em que o animal permaneceu com as quatro patas em cada compartimento foi registrado com o auxílio de cronômetros, sendo que caso o animal permanecesse no portal que divide os dois compartimentos, o tempo não era contado. O resultado é mostrado como

porcentagem do tempo gasto no compartimento familiar (F) ou não-familiar (N) em relação ao tempo total (F + N). Os animais capazes de discriminar os dois compartimentos pelo seu odor permanecerão no compartimento familiar mais que 50% do tempo (valor teórico esperado para o acaso).

3.4.6. Splash

O protocolo utilizado foi adaptado de MORETTI et al. 2015. O teste é feito em funis de vidro invertidos para facilitar a observação dos animais. Os camundongos foram colocados nos funis, isolados visualmente uns dos outros, e deixados para que se habituassem ao novo ambiente por cerca de 3 min. Logo em seguida, receberam duas borrifadas no dorso com solução de sacarose 10%. O seu comportamento foi então observado por 5 min. Após o teste, os animais foram colocados em novas gaiolas para que não entrassem em contato com os animais ainda não testados.

Como a solução é viscosa, os animais tenderão a iniciar o comportamento de *grooming* (lamber/arrumar os pelos do local). Também porque a solução é palatável, os animais tendem a continuar esse comportamento. Portanto, dois parâmetros são medidos pelo observador treinado com ajuda de cronômetros, o tempo de latência até o início do *grooming* e o tempo total que o animal manifesta esse comportamento. Uma redução dos comportamentos relacionados a autolimpeza e de motivação neste teste são indicativos de anedonia (MATHEUS et al. 2015 e MORETTI et al. 2015)

3.4.7. Nado forçado

Esse teste, inicialmente desenvolvido para ratos (PORSOLT et al. 1977), se baseia no princípio que o animal quando forçado a nadar sem que lhe seja dado uma possibilidade de escape, após um período de atividade intensa, tenderá a ficar imóvel executando apenas os movimentos respiratórios e necessários para manter a cabeça acima da superfície da água. Esse comportamento de imobilidade está relacionado a um estado de desespero/desesperança, onde o animal, tendo aprendido que não há escapatória, se conforma com as condições experimentais – assemelhando-se, assim, ao comportamento humano na depressão.

O protocolo aqui utilizado baseou-se em uma adaptação mais recente para camundongos (CAN et al. 2012) e o tempo após as injeções foi escolhido baseando-se em trabalho anterior do grupo (LEDO et al.

2013). Beckers de vidro de 2 L, isolados visualmente entre si, de 13 cm de diâmetro foram preenchidos com água a 23 °C até a altura de 13,5 cm. Os animais foram colocados na água e deixados por 6 min. Após o teste, os animais foram colocados em gaiolas com maravalha seca, cobertas, sob uma luz quente para que se secassem isolados dos animais ainda não testados.

Os dois primeiros minutos de teste foram desprezados, o comportamento dos animais foi avaliado durante os 4 minutos finais por um observador treinado. Com ajuda de cronômetros, foi registrado o tempo de mobilidade (todo movimento além do necessário para manter a cabeça acima da superfície d'água), depois este tempo foi subtraído do tempo total (240 s) para obter-se o parâmetro de imobilidade.

3.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1. Imunoquantificação de proteínas

Após os experimentos comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e tiveram o hipocampo dissecado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para análise por *western blot* seguindo protocolo descrito anteriormente (CLARKE et al. 2015). O tecido foi macerado e homogeneizado em tampão de radioimunoprecipitação (RIPA), (50 mM Trisma, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X 100, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, pH 7,4) com inibidores de protease e fosfatase 1:50, centrifugado a 1000G / 5 min / 4 °C e o sobrenadante foi recolhido. A quantidade de proteína foi dosada pelo método de Bradford usando albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD 1976). Quantidade suficiente para 45 µg de proteína em solução contendo glicerol 1:10, beta-mercaptanol 1:100 e azul de bromofenol, previamente fervida, foi aplicada em um gel de poliacrilamida 12% para eletroforese, a corrida foi feita a 100 V por cerca de 90 min.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose sob a corrente de 350 mA e 100 V por 60 min. As membranas foram bloqueadas por uma hora com *Odyssey Blocking Buffer* (LI-COR, EUA). As membranas foram depois incubadas com os anticorpos anti-IBA-1 (17 kDa) e anti-GFAP (55 kDa) durante a noite a 4 °C, já com os anticorpos anti-ciclofilina-B (21 kDa) e secundários, foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente. A revelação se deu através do sistema de escaneamento de fluorescência *Odyssey* (LI-

COR) e a densitometria das bandas através do programa ImageJ, (NIH, EUA).

Todos os anticorpos foram diluídos em *Odyssey Blocking Buffer*. Os anticorpos utilizados foram anti-IBA-1 1:1000 (Abcam 5076, EUA) e secundário anti-cabra 1:5000 (fluorescência a 700 nm); anti-GFAP 1:1000 (DAKO Z0334, Dinamarca) e secundário anti-coelho 1:5000 (fluorescência a 800 nm); anti-ciclofilina-B 1:1000 (Abcam 16045) e secundário anti-coelho (1:5000, fluorescência a 800 nm). A ciclofilina-B é uma proteína abundante que se liga a ciclosporina, aqui foi utilizada como controle de carga (STÜRZENBAUM SR 2001).

3.5.2. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (*in vitro*)

Foram utilizadas culturas primárias de neurônios hipocâmpais de embriões de 16 a 18 dias de ratos Wistar, cultivadas em meio Neurobasal suplementado com B27 e l-glutamina (Invitrogen, EUA) por 21 dias. O ensaio foi feito conforme o protocolo descrito anteriormente (DE FELICE et al. 2007). A sonda utilizada, H₂DCFDA (2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato, Invitrogen, EUA), não é fluorescente. Uma vez na célula, tendo seu grupamento acetato clivado por esterases e oxidada, a molécula é convertida ao DCF (2',7'-diclorofluoresceína), altamente fluorescente.

As células foram primeiramente incubadas com PBS, 0,5 μM NPY ou 0,5 μM NPY₍₁₃₋₃₆₎ por 30 min, então receberam veículo ou 0,5 μM AβO e foram novamente incubadas por 330 min. Assim foram constituídas 6 condições: PBS + veículo (triplicatas), NPY + veículo (duplicatas), NPY₍₁₃₋₃₆₎ + veículo (duplicatas), PBS + AβO (triplicatas), NPY + AβO (triplicatas), NPY₍₁₃₋₃₆₎ + AβO (triplicatas). Após, todos os poços foram incubados com 2 μM H₂DCFDA por mais 30 min. Antes da leitura no microscópio, todos os poços foram lavados com PBS e colocados meio de cultura novo, os poços de controle positivo receberam peróxido de hidrogênio cerca de 5 min antes da leitura.

As imagens foram captadas através de um microscópio de fluorescência invertido (Zeiss, Alemanha). Foram fotografados três campos representativos de cada poço, as fotos foram tiradas por um experimentador cego para as condições dos poços e nas mesmas configurações de exposição e ganho. Em todos os campos foram tiradas fotos no canal de contraste de interferência diferencial (DIC) e fluorescência (excitação a 495 nm e emissão a 520 nm) para a sobreposição. A quantificação da fluorescência foi feita pelo programa

Image J e os resultados levaram em consideração os valores médios de fluorescência por campo normalizados pelo grupo controle (PBS + veículo).

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism v. 6 e utilizaram como níveis de significância 5%. Nos experimentos de reconhecimento de objetos, localização de objetos, labirinto aquático (teste) e discriminação olfatória foi utilizado o teste-t contra o valor teórico de 50% (*one-sample t-test*). No teste do *splash* foi utilizada análise de variância não-paramétrica *Kruskal-Wallis* e *pos-hoc Dunn's*. Para todos os demais, foi utilizado análise de variância (ANOVA) de duas vias (de medidas repetidas, quando necessário) e teste *pos-hoc* de *Holm-Sidak*.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITOS DO ENVELHECIMENTO E DO TRATAMENTO COM NEUROPEPTÍDEO Y SOBRE PARÂMETROS LOCOMOTORES E COGNITIVOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6

4.1.1. Parâmetros locomotores

Os animais com 2 e 11 meses de idade foram avaliados em duas ocasiões no campo aberto, antes e após a injeção i.c.v. com NPY (23,4 pmol). O fator idade não teve qualquer influência sobre a distância percorrida pelos animais ou mesmo sobre o tempo gasto no quadrante central do campo aberto (**Figura 3**). Este é um achado importante para os experimentos subsequentes que avaliaram a memória dos animais, uma vez que um prejuízo na locomoção poderia prejudicar a exploração dos animais e portanto seu desempenho nessas tarefas, dificultando a interpretação dos resultados.

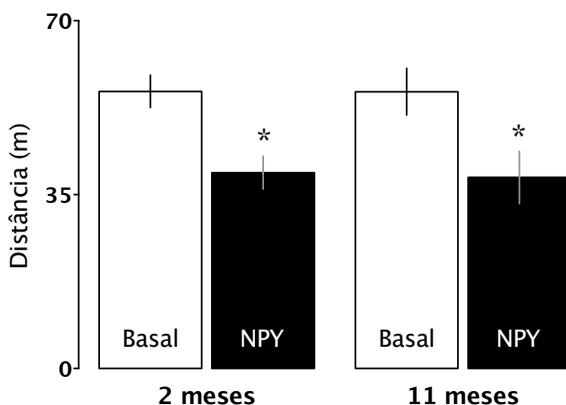
Por outro lado, os fatores repetição e/ou o tratamento influenciaram o desempenho no teste do campo aberto, diminuindo significativamente a distância percorrida pelos animais (**Figura 3a**). A ANOVA com medidas repetidas indicou um efeito significativo para o fator de repetição (depois do tratamento com NPY) nesse parâmetro ($p < 0,0001$). Da mesma forma, o teste *pos-hoc* de múltiplas comparações *Holm-Sidak* revelou que há diferenças significativas entre as exposições antes e depois do tratamento com NPY em ambos grupos de animais com 2 meses ($p = 0,044$) e 11 meses de idade ($p = 0,044$).

Como as distâncias percorridas foram muito diferentes entre os dois experimentos, para permitir a avaliação do efeito do tratamento e da repetição sobre o tempo no quadrante central, o tempo total nesse quadrante foi normalizado pela distância percorrida (**Figura 3b**). No entanto, não houve qualquer influência nesse parâmetro por essas variáveis.

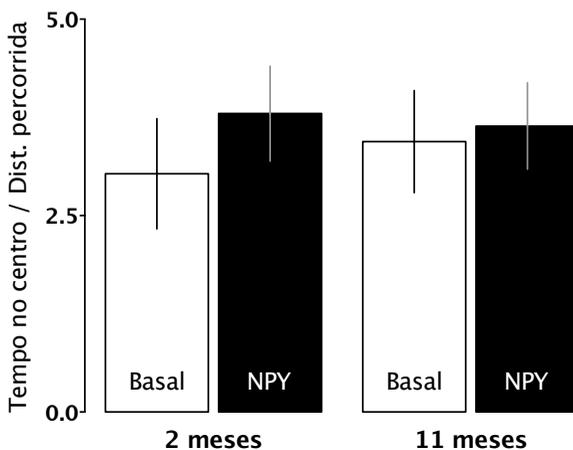
Figura 3. Efeitos do envelhecimento e do tratamento com NPY sobre a locomoção.

Camundongos C57BL/6 com 2 e 11 meses de idade foram avaliados no teste do campo aberto por 30 min, antes ou após 5 dias da injeção i.c.v. com NPY (23,4 pmol). a) Distância percorrida; b) Tempo no quadrante central normalizado pela distância percorrida. * $p < 0,05$ comparado à primeira exposição do mesmo grupo (antes do tratamento com NPY). ANOVA de medidas repetidas, teste *pos-hoc* de *Holm-Sidak*. Valores representados como média \pm EPM. $n = 9$ a 10 animais/grupo.

a)



b)



4.1.2. Parâmetros cognitivos

A avaliação da memória espacial dos camundongos C57BL/6 com 2 e 11 meses de idade antes e após o tratamento com NPY (23,4 pmol) foi avaliada através do experimento de localização de objetos. Durante o treino, todos os animais investigaram os dois objetos de maneira semelhante, indicando ausência de preferência por algum deles (**Figura 4a**).

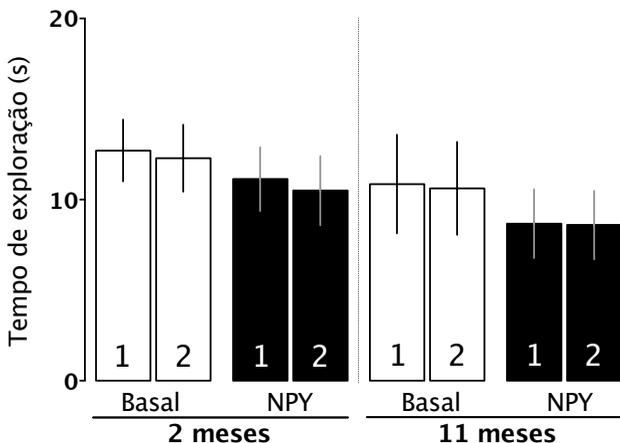
É possível observar na **Figura 4b** que antes do tratamento com NPY, os animais envelhecidos (11 meses) não foram capazes de discriminar o objeto realocado, explorando de maneira semelhante os dois objetos ($p = 0,4111$, *one-sample t-test* contra o valor teórico para o acaso, 50%). Entretanto, esta condição mudou após o tratamento com NPY, e os mesmos animais passaram a ser capazes de realizar a tarefa, demonstrando uma preferência pelo objeto realocado sobre aquele mantido na posição familiar ($p = 0,029$, *one-sample t-test* contra o valor teórico para o acaso, 50%). Esse resultado indica que o tratamento com NPY foi capaz de reverter o prejuízo de memória espacial associado ao envelhecimento em camundongos.

Curiosamente, o tratamento com NPY e/ou a repetição parecem ter prejudicado essa memória nos animais jovens (2 meses) (**Figura 4b**). Antes do tratamento com NPY, esses animais apresentaram uma preferência pelo objeto realocado que não foi significativa estatisticamente ($p = 0,053$, *one-sample t-test* contra o valor teórico para o acaso, 50%). Porém, após o tratamento, os mesmos animais tiveram um desempenho pior no mesmo teste, não discriminando entre o objeto mantido na posição familiar e aquele realocado ($p = 0,1132$, mesmo teste estatístico).

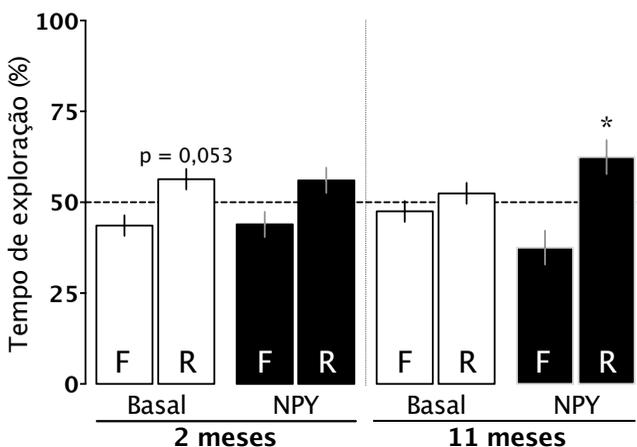
Figura 4. Efeitos do envelhecimento e do tratamento com NPY sobre a memória espacial.

Camundongos C57BL/6 com 2 e 11 meses de idade foram submetidos ao teste de localização de objetos antes e 6 dias após o tratamento com NPY (23,4 pmol). a) Treino, (1) e (2) representam dois objetos idênticos lado a lado; b) Teste, (F) representa o objeto na posição familiar e (R) o objeto realocado. * Diferente do valor teórico 50% (*one-sample t-test*, $p < 0,05$). Valores representados como média \pm EPM. $n = 9$ a 10 animais/grupo.

a)



b)



4.2. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE NPY E NPY₍₁₃₋₃₆₎ SOBRE OS PREJUÍZOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS POR OLIGÔMEROS DE β -AMILÓIDE

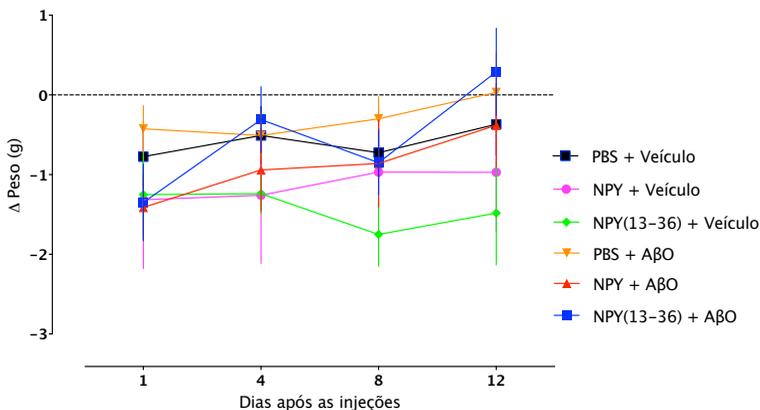
4.2.1. Peso de camundongos suíços machos

Os camundongos suíços com 3 meses de idade foram pesados 24 horas antes do início dos experimentos de onde foi estabelecido um peso basal para cada animal, (média 39,78 g, desvio padrão 7,04 g). Após 24 horas, 4, 8 e 12 dias das injeções i.c.v. de NPY, NPY₍₁₃₋₃₆₎ e A β O foram pesados novamente. Com essas medidas foi estabelecido um delta, diferença das pesagens obtidas após as injeções do peso basal para cada animal.

Pode-se observar na **figura 5** que todos os grupos tiveram uma queda no peso 24 horas após as injeções, tendendo a estabilizar ou retomar a medidas basais ao longo dos dias de experimentação. A ANOVA com medidas repetidas indicou um efeito significativo para o fator tempo após as injeções ($p = 0,0135$). Entretanto, nenhum dos tratamentos induziu mudanças significativas nos pesos obtidos.

Figura 5. Avaliação do peso dos animais após os tratamentos com PBS, NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e com veículo ou A β O.

Os animais receberam injeções i.c.v. com PBS, NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e depois com veículo ou A β O. Vinte e quatro horas antes (medida basal) e após 1, 4, 8 e 12 dias dos tratamentos os animais foram pesados. Δ Peso é a diferença do valor obtido nos diferentes dias após os tratamentos em relação à medida basal. Valores representados como média \pm EPM, n = 7 a 12 animais/grupo.



4.2.2. Locomoção

Camundongos suíços machos de 3 meses de idade receberam uma injeção i.c.v. com PBS, NPY (23,4) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎, 15 min depois, outra injeção i.c.v. contralateral com veículo ou A β O (10 pmol). Posteriormente, os camundongos foram avaliados em duas ocasiões: 24 h após os tratamentos por um período de 5 min (**Figura 6a e b**) e 6 dias após os tratamentos por 30 min (**Figura 6c, d e e**).

Nenhum dos tratamentos foi capaz de modificar os parâmetros locomotores aferidos, (**Figura 6a, b, c e d**). Além disso, todos os grupos apresentaram habituação ao campo aberto, como pode ser evidenciado na **Figura 6e**. Nesta figura, a distância percorrida é apresentada em intervalos menores, de 5 em 5 min. Pode-se perceber que os animais tendem a diminuir a locomoção conforme o passar do tempo de teste, demonstrando estarem se habituando ao novo ambiente. A ANOVA com medidas repetidas revela que o tempo foi um fator significativo de variação ($p < 0,0001$), e o pós-teste *Holm-Sidak* mostrou que à partir do ponto de 20 min, em todos os grupos, houveram diferenças significativas em relação aos primeiros cinco minutos. Esses resultados em conjunto indicam que os tratamentos não acarretaram em prejuízos locomotores, o que é importante para a interpretação dos resultados dos testes subsequentes de aprendizado e memória.

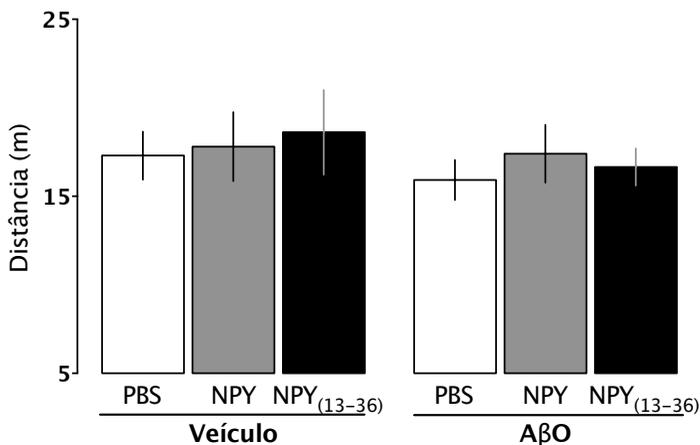
A fim de avaliar um possível efeito da repetição sobre a locomoção dos animais, os resultados da primeira (24 h) e da segunda (6 dias) exposição ao campo aberto foram comparados (**Figura 7**), para tanto, apenas os resultados dos primeiros cinco minutos de teste da segunda exposição foram utilizados. Quanto a distância percorrida (**Figura 7a**), a ANOVA com medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator repetição ($p = 0,0002$). Além disso, para o grupo PBS + veículo, a distância percorrida nos dois testes se mostrou significativamente diferente ($p = 0,0408$, teste pós-hoc *Holm-Sidak*).

Considerando que as distâncias percorridas foram muito diferentes nos dois testes, seria inapropriado compará-los pelo tempo no quadrante central diretamente. Para resolver esse problema, o tempo no quadrante central foi normalizado pela distância percorrida para cada animal. O resultado é mostrado na **Figura 7b** como a razão do tempo no centro pela distância percorrida. Não houveram modificações nesse parâmetro pelo fator repetição.

Figura 6. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e da injeção com A β O sobre parâmetros locomotores.

Os animais receberam injeções i.c.v. com PBS, NPY (23,4 pmol) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol) e com veículo ou oligômeros de β -amilóide (10 pmol). (a) e (b) Após 24 h, os animais foram colocados no aparato de campo aberto e tiveram seu comportamento avaliado por 5 min. a) Distância percorrida; b) Tempo no quadrante central. n = 8 a 12 animais/grupo.

a)



b)

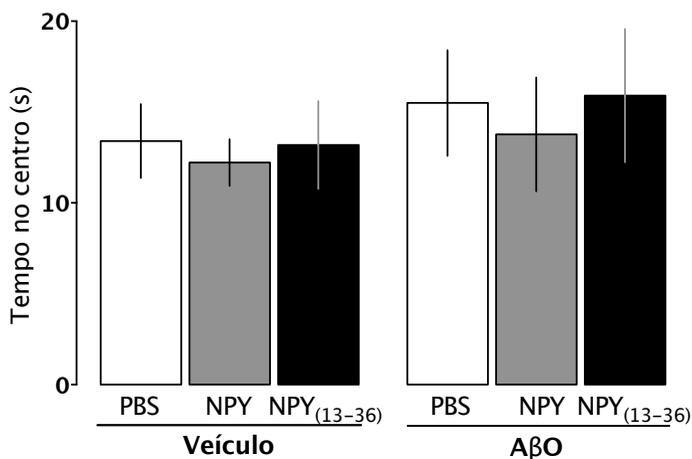


Figura 6. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e da injeção com AβO sobre parâmetros locomotores.

(c) (d) e (e) 6 dias após as injeções, os animais foram recolocados no aparato de campo aberto e tiveram seu comportamento avaliado por 30 min. c) Distância percorrida; d) Tempo no quadrante central. e) Curva de habituação, distância percorrida total analisada em segmentos consecutivos de 5 min. n = 7 a 12 animais/grupo. Valores representados como média ± EPM.

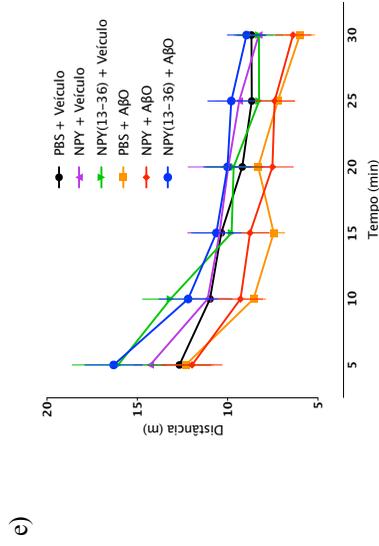
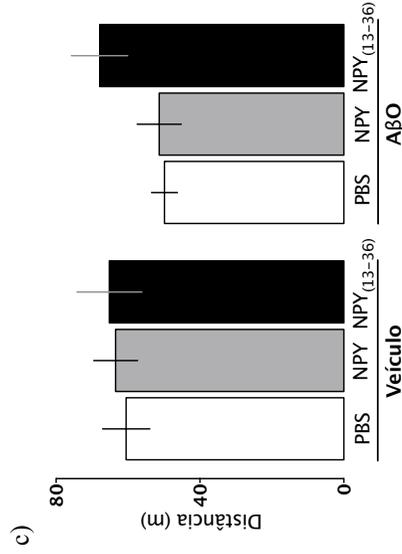
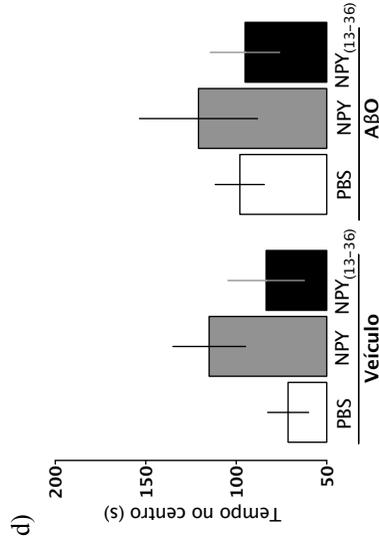
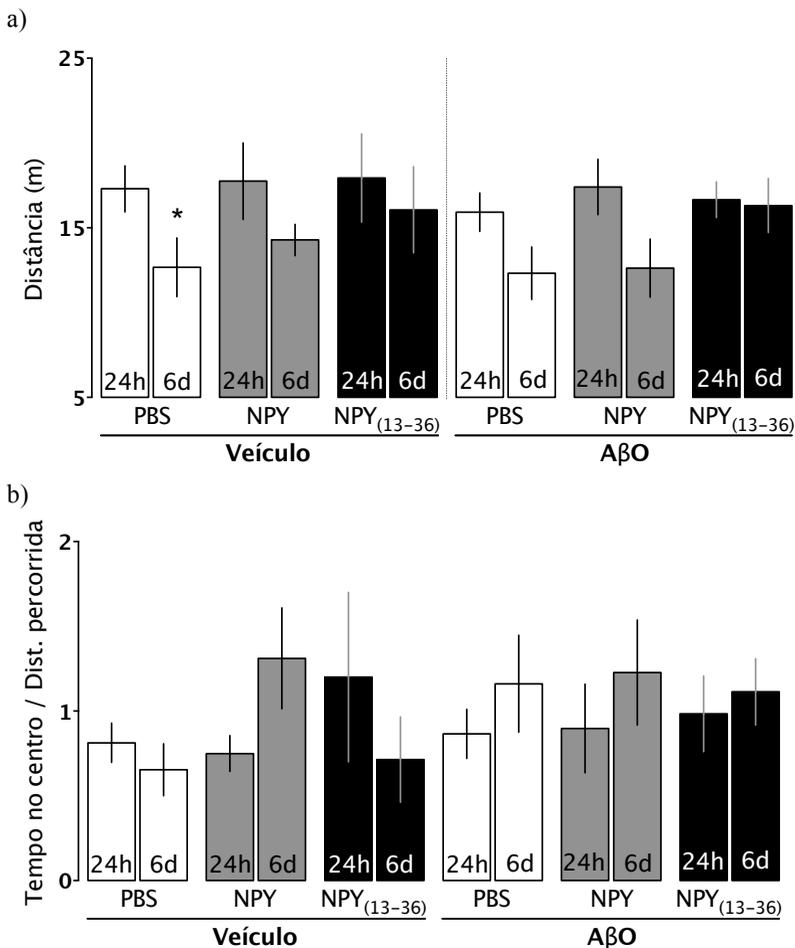


Figura 7. Efeitos do fator de repetição no teste do campo aberto sobre parâmetros locomotores.

Os animais receberam injeções i.c.v. com PBS, NPY (23,4 pmol) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol) e com veículo ou oligômeros de β-amilóide (10 pmol). Após 24h e 6 dias das injeções, os animais tiveram seu comportamento avaliado no campo aberto. a) Distância percorrida. b) Tempo no quadrante central normalizado pela distância percorrida. * Diferente da primeira exposição (24h) do mesmo grupo, (p < 0,05, ANOVA de medidas repetidas, pós-teste *Holm-Sidak*). Resultados são valores de média ± EPM. n = 7 a 12 animais / grupo.



4.2.3. Memória de reconhecimento de curto prazo

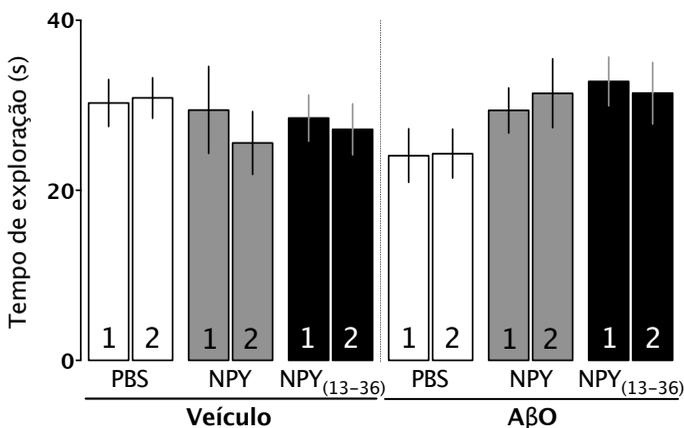
Vinte e quatro horas após as injeções, os camundongos foram submetidos ao experimento de reconhecimento de objetos. Na sessão treino, os animais foram expostos a dois objetos iguais, mostrando ausência de preferência pelos objetos (**Figura 8a**). Na sessão teste, um dos objetos foi substituído por um novo (**Figura 8b**). Como esperado, o grupo controle (PBS + veículo) preferiu o objeto novo em comparação ao objeto familiar ($p = 0,0066$ no *teste-t* contra o valor teórico para o acaso 50%). Isso demonstra a sua capacidade de discriminá-los e reconhecer o objeto familiar como tal. Já o grupo tratado com PBS + A β O não foi capaz de reconhecer o objeto familiar, investigando de maneira semelhante os dois objetos.

Os pré-tratamentos *per se* não interferiram nessa memória, e os animais tratados com NPY + veículo ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ + veículo, de maneira semelhante ao controle, preferiram o objeto novo em relação ao objeto familiar ($p = 0,015$ e $0,046$, respectivamente, no *teste-t* contra o valor teórico para o acaso 50%). Mais importante, o tratamento com NPY foi capaz de prevenir o prejuízo nessa memória induzida por A β O, uma vez que os animais desse grupo exploraram significativamente mais tempo o objeto novo ($p = 0,0293$ no *teste-t* contra o valor teórico para o acaso 50%). O tratamento com NPY₍₁₃₋₃₆₎, no entanto, não foi capaz de prevenir os prejuízos induzidos por A β O nesse teste. Apesar destes animais apresentarem uma preferência pelo objeto familiar, essa preferência não apresentou significância estatística ($p = 0,1074$ no mesmo teste estatístico).

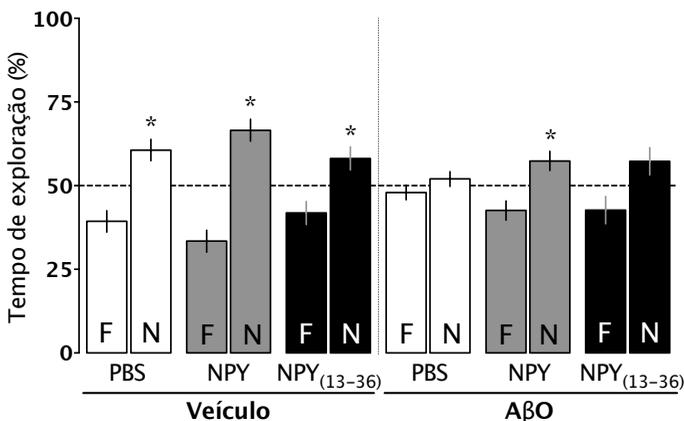
Figura 8. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e da injeção com A β O sobre a memória de reconhecimento de curto prazo.

Os animais receberam injeções i.c.v. com PBS, NPY (23,4 pmol) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol) e com veículo ou A β O (10 pmol). Vinte e quatro horas após, os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento de objetos. a) Treino, (1) e (2) representam dois objetos idênticos; b) Teste, (F) representa o objeto familiar e (N) o objeto novo. * Diferente do valor teórico 50%, (*one-sample t-test*, $p < 0,05$). Valores representados como média \pm EPM, $n = 8$ a 12 animais/grupo.

a)



b)



4.2.4. Memória espacial de curto e longo prazo

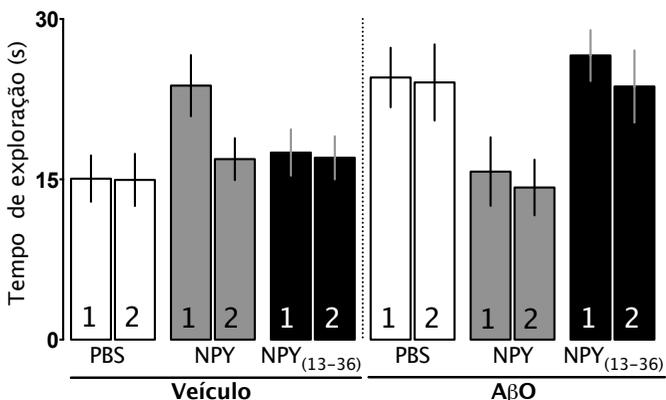
Sete dias após os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste de localização de objetos para avaliação da memória espacial de curto prazo. Durante o treino, nenhum dos grupos teve preferência por algum dos objetos (**Figura 9a**). Como esperado, durante o teste (**Figura 9b**) os animais do grupo PBS + veículo exploraram significativamente por mais tempo o objeto realocado do que o familiar ($p = 0,0495$ no *test-t* contra o valor teórico para o acaso 50%), demonstrando serem capazes de discriminar a localização dos objetos. Já o grupo PBS + A β O explorou de maneira semelhante os dois objetos, revelando um prejuízo nessa memória espacial de curto prazo.

Além disso, ambos os pré-tratamentos com NPY e NPY₍₁₃₋₃₆₎ foram capazes de prevenir o prejuízo de memória induzido por A β O nesse teste, ($p = 0,0286$ e $0,0483$, respectivamente, no mesmo teste estatístico). Demonstrando que a ativação do receptor Y₂, nesse caso, é suficiente para a neuroproteção induzida pelo NPY. Curiosamente, o grupo NPY₍₁₃₋₃₆₎ + veículo também apresentou um prejuízo nessa memória, não demonstrando uma preferência significativa pelo objeto realocado. O mesmo não ocorre com o grupo NPY + veículo, que preferiu o objeto realocado, ($p = 0,0013$ no *test-t* contra o valor teórico para o acaso 50%).

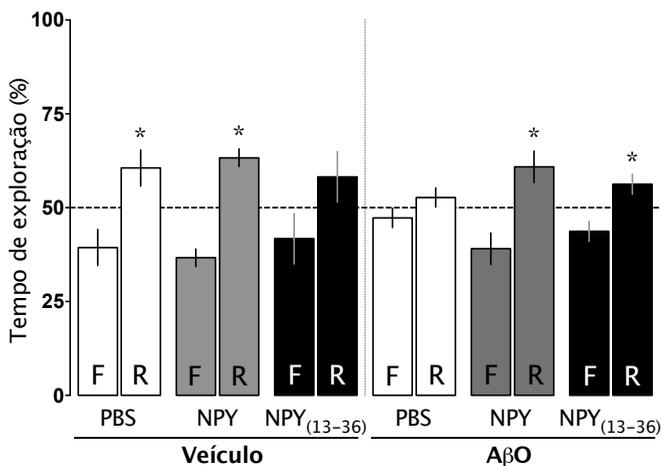
Figura 9. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e da injeção com A β O sobre a memória espacial de curto prazo.

Os animais receberam injeções i.c.v. com PBS, NPY (23,4 pmol) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol) e com veículo ou A β O (10 pmol). Após 7 dias, os animais foram submetidos à tarefa de localização de objetos. a) Treino, (1) e (2) representam dois objetos idênticos lado a lado; b) Teste, (F) representa o objeto na posição familiar e (R) o objeto realocado. * Diferente do valor teórico 50%, (*one-sample t-test*, $p < 0,05$). Valores representados como média \pm EPM. $n = 7$ a 12 animais/grupo.

a)



b)

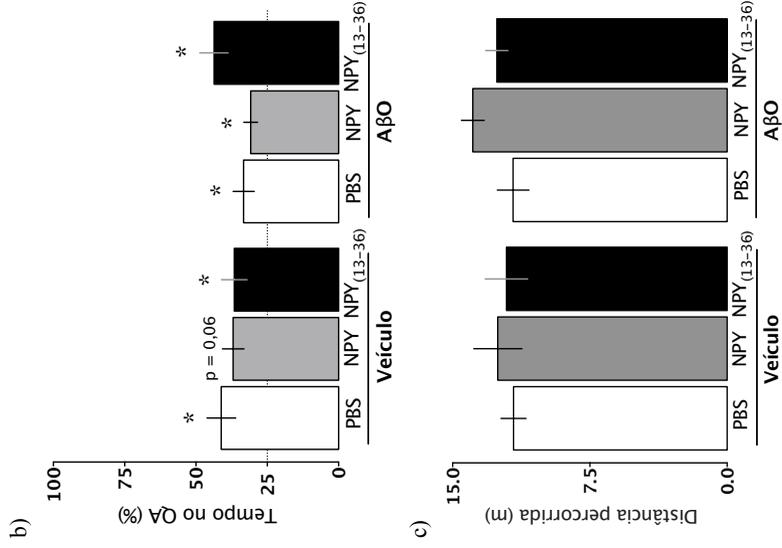


Para avaliarmos os efeitos dos pré-tratamentos e da injeção com A β O sobre o aprendizado e a memória espacial de longo prazo, os mesmos animais foram submetidos a um protocolo de labirinto aquático que se iniciou 11 dias após os tratamentos (**Figura 10**). Todos os grupos foram capazes de aprender a tarefa ao longo dos dias de treinamento (**Figura 10a**), demonstrando, à partir do terceiro dia de treino, latências para achar a plataforma significativamente diferentes da do primeiro dia ($p < 0,05$, ANOVA com medidas repetidas, pós-teste *Holm-Sidak*).

Após 24 h do fim da sessão de treinamento, foi realizado o teste (sem a plataforma). O tempo gasto pelos animais em cada quadrante foi aferido (**Figura 10b**). Todos os grupos passaram significativamente mais tempo no quadrante-alvo do que nos demais, ($p < 0,05$ no teste-*t* contra o valor teórico para o acaso, 25%), com exceção do grupo NPY + veículo, ($p = 0,06$ no teste-*t* contra o valor teórico para o acaso, 25%). Todos os grupos percorreram distâncias semelhantes durante o teste (**Figura 10c**), revelando ausência de possíveis prejuízos no nado causados pelos diferentes tratamentos.

Figura 10. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e da injeção com A β sobre o aprendizado e memória espacial de longo prazo

Onze dias após as injeções com PBS, NPY (23,4 pmol) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol) e com veículo ou A β (10 pmol), foi iniciado o treinamento do labirinto aquático. a) Tempo de latência até a plataforma. Após 24 h após o treinamento, os animais foram submetidos ao teste sem a plataforma. b) Tempo no quadrante alvo (QA). c) Distância percorrida. * Diferente do valor teórico 25% (*one-sample t-test*, $p < 0,05$). Valores representados como média \pm EPM, $n = 7$ a 12 animais/grupo.



4.2.5. Comportamentos emocionais

No teste do *splash* são avaliados parâmetros relacionados a apatia e anedonia indicados pela latência até o início do comportamento de *grooming* e o tempo total de *grooming* (**Figura 11**). Nos grupos tratados com A β O, além das medianas das latências terem sido muito superiores, os valores ficaram também mais dispersos, bem diferente do observado nos grupos que receberam veículo (**Figura 11a**). De maneira interessante, resultado semelhante foi observado no tempo de *grooming* (**Figura 11b**). Embora as medianas não tenham variado muito entre os grupos, claramente há uma maior dispersão dos valores no grupo PBS + A β O.

É possível identificar claramente duas populações distintas no grupo PBS + A β O separadas pelo valor da mediana nesses parâmetros, (**Figura 11c**); uma que se comporta semelhantemente ao grupo controle (PBS + veículo) e outra com valores de latência bem altos e valores de *grooming* baixos. É válido ressaltar que os mesmos animais que tiveram os valores de latência acima da mediana do grupo tiveram também os valores de *grooming* abaixo da mediana. Quando comparadas, essas populações são diferentes nos dois parâmetros, (latência: $p < 0,0001$; *grooming*: $p = 0,0008$, Teste-t).

No nado forçado, foi medido o tempo de imobilidade durante os quatro minutos finais de teste. Não foi detectado nenhuma diferença significativa entre os grupos neste teste (**Figura 12**).

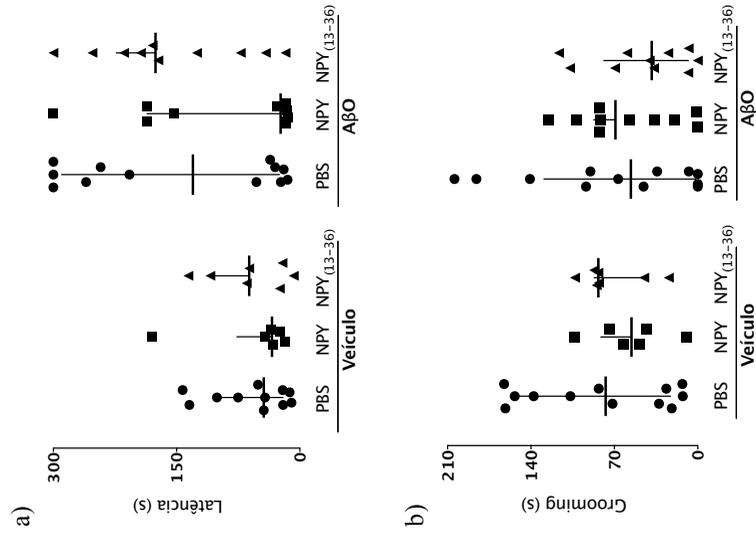


Figura 11. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e da injeção com AβO sobre o comportamento do tipo anedônico/apático.

Cinco dias após as injeções com PBS, NPY (23,4 pmol) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol), e com veículo ou oligômeros de β-amilóide (10 pmol), os animais foram submetidos ao teste do *splash*. a) Tempo de latência até o primeiro comportamento de *grooming*. b) Tempo total de *grooming*. Valores representados como mediana ± intervalo interquartil, n = 7 a 12 animais/grupo. c) Subpopulações (branco e preto) do grupo PBS + AβO com valores acima e abaixo da média na latência e no *grooming*. * p < 0,05, teste-t. Valores representados como média ± EPM, n = 6 animais/subgrupo.

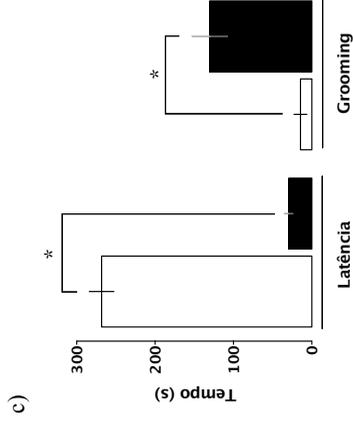
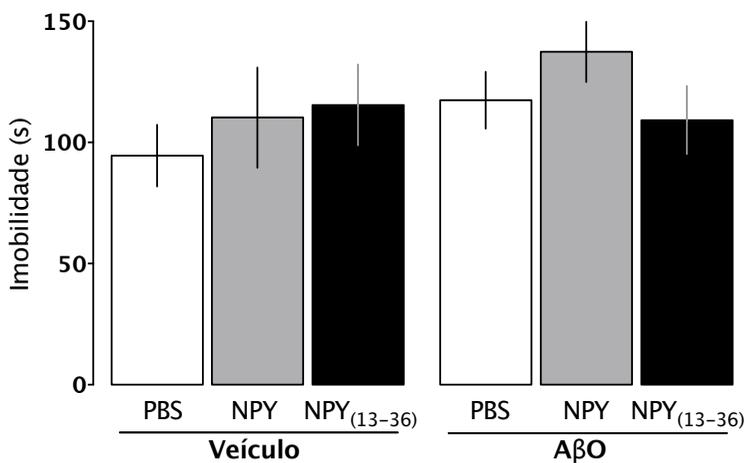


Figura 12. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e da injeção com A β O sobre o comportamento do tipo depressivo.

Os animais receberam injeções i.c.v. com PBS, NPY (23,4 pmol) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol) e após com veículo ou oligômeros de β -amilóide (10 pmol). Oito dias após os animais foram submetidos ao teste de nado forçado por 6 min. Os dois primeiros minutos (habituação) foram desprezados, o tempo de imobilidade foi contado nos 4 min seguintes. Valores representados como média \pm EPM, n = 7 a 12 animais/grupo.



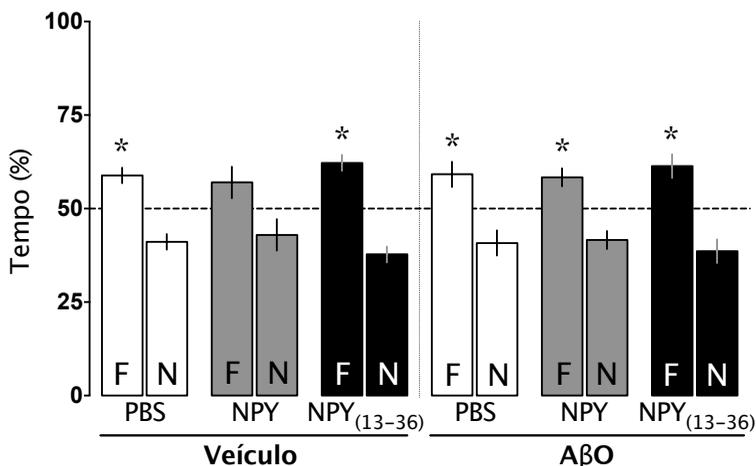
4.2.6. Discriminação olfatória

Para avaliar um possível efeito dos oligômeros de β -amilóide e dos tratamentos com NPY ou com o agonista do receptor Y_2 , NPY₍₁₃₋₃₆₎ sobre a capacidade de discriminação olfatória, os animais foram submetidos a uma tarefa onde deveriam diferenciar dois compartimentos: com maravalha limpa (não-familiar) e com maravalha impregnada com seu próprio odor (familiar), (**Figura 13**).

Todos os grupos permaneceram mais tempo no compartimento com maravalha familiar, indicando ausência de comprometimento olfatório. A única exceção foi o grupo tratado com NPY + veículo, nesse grupo, a preferência pelo compartimento familiar não foi significativa estatisticamente, ($p = 0,1402$ no teste-t contra o valor teórico 50%).

Figura 13. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e da injeção com A β O sobre a discriminação olfatória.

Os animais receberam uma injeção i.c.v. com PBS, NPY (23,4 pmol) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol) e com veículo ou oligômeros de β -amilóide (10 pmol). Quatro dias depois, os animais foram submetidos ao teste de discriminação olfatória. (F) compartimento com maravalha familiar, (N) compartimento com maravalha não-familiar. O tempo gasto em cada compartimento foi avaliado. * Diferente do valor teórico 50% (*one-sample t-test*, $p < 0,05$). Valores representados como média \pm EPM, $n = 7$ a 12 animais/grupo.



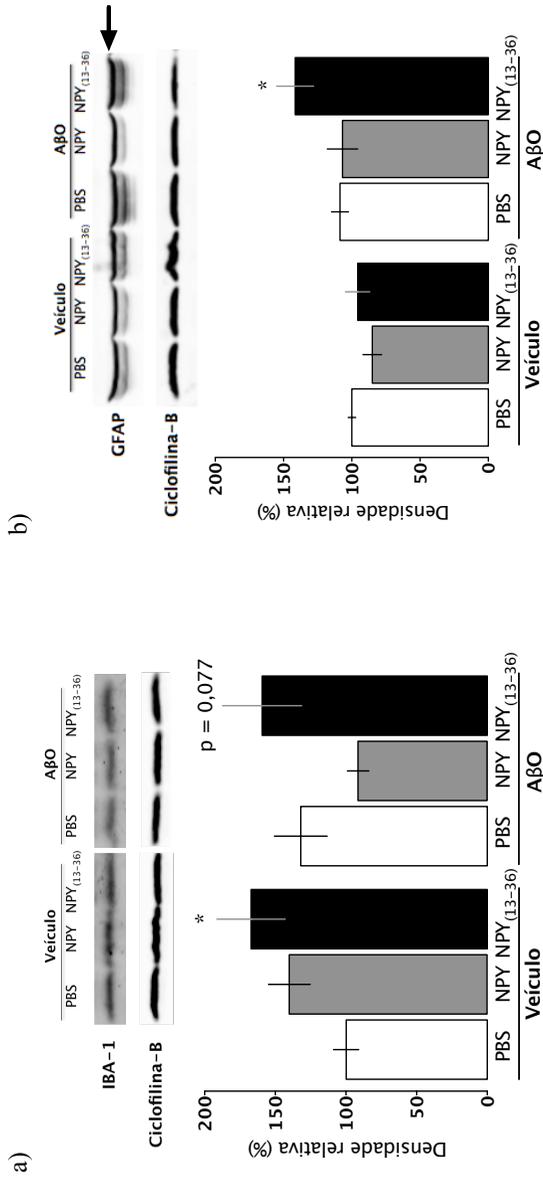
4.2.7. Quantidade relativa de IBA-1 e GFAP no hipocampo

Foram medidas as quantidades relativas de IBA-1 e GFAP (proteínas abundantes em micróglia e astrócitos, respectivamente), nos hipocampus dos animais coletados 15 dias após as injeções i.c.v. através da técnica de *western-blot* (**Figura 14**).

Em relação a IBA-1 (**Figura 14a**), a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator pré-tratamento ($p = 0,0186$). Além disso, o grupo NPY₍₁₃₋₃₆₎ + veículo foi significativamente diferente do grupo controle (PBS + veículo), ($p = 0,0455$, teste pós-hoc de *Holm-Sidak*). O grupo NPY₍₁₃₋₃₆₎ + A β O também mostrou uma forte tendência a ser diferente do controle ($p = 0,077$ no referido teste). Já as quantidades de GFAP no hipocampo dos animais não diferiram estatisticamente entre um grupo e outro (**Figura 14b**), com exceção do grupo que recebeu NPY₍₁₃₋₃₆₎ + A β O, que também foi significativamente maior do que do grupo controle ($p = 0,0105$, teste pós-hoc de *Holm-Sidak*).

Figura 14. Efeitos do pré-tratamento com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ sobre a imunodeteção de GFAP e IBA-1.

Quinze dias após receberem injeções i.c.v. com PBS, NPY (23,4 pmol) ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ (23,4 pmol) e com veículo ou oligômeros de β -amilóide (10 pmol; 15 min depois), os animais foram sacrificados e tiveram o hipocampo dissecado para análise por *Western-Blot*. Superior: a) imagem representativa da marcação por anti-IBA-1 (17 kDa) e anti-Ciclofilina-B (21 kDa). b) imagem representativa da marcação por anti-GFAP (55 kDa) e anti-Ciclofilina-B. Inferior: resultados da densitometria das bandas de (a) IBA-1 e (b) GFAP em relação ao controle de carregamento (Ciclofilina-B) e ao grupo controle (PBS + Veículo). * Diferente do grupo PBS + Veículo, $p < 0,05$, ANOVA de duas vias, pós-teste *Holm-Sidak*. Valores representados como média \pm EPM, $n = 4$ a 7 animais/grupo.



4.2.8. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) *in vitro*

Avaliamos no presente estudo os efeitos do pré-tratamento com NPY ou com o agonista do receptor Y_2 , NPY₍₁₃₋₃₆₎, sobre a formação de ROS induzida por A β O em cultura primária de neurônios hipocampais (**Figura 15a**). Os pré-tratamentos não induziram a formação de ROS *per se*, (**Figura 15b**), sendo os valores obtidos de intensidade de fluorescência semelhantes aos do controle.

A ANOVA com duas vias indicou um efeito significativo para o fator de tratamento com A β O no parâmetro aferido relativo a produção de ROS, intensidade de fluorescência ($p = 0,0499$). Embora haja uma clara tendência, o aumento na intensidade de fluorescência no grupo PBS + A β O não se mostrou estatisticamente significante quando comparado ao controle através do teste *pos-hoc* de *Holm-Sidak* ($p = 0,0864$). O pré-tratamento com NPY₍₁₃₋₃₆₎ aparentemente atenuou a formação de ROS induzida pelos A β O nesse experimento. No entanto, faz-se necessário aumentar o n para confirmar esses dados, uma vez que os resultados foram obtidos de uma amostra independente por grupo (processado e avaliado em triplicata).

Figura 15. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ sobre a produção de ROS induzida por A β *in vitro*.
 Culturas de neurônios hipocâmpais de rato foram pré-tratadas com PBS, 0,5 μ M NPY ou 0,5 μ M NPY₍₁₃₋₃₆₎ por 30 min antes de receberem veículo ou 0,5 μ M A β . 330 min depois as culturas receberam 2 μ M H₂DCFDA. a) Imagens representativas de campos nos canais de contraste de interferência diferencial (DIC) ou fluorescência, e a sobreposição dos dois canais.

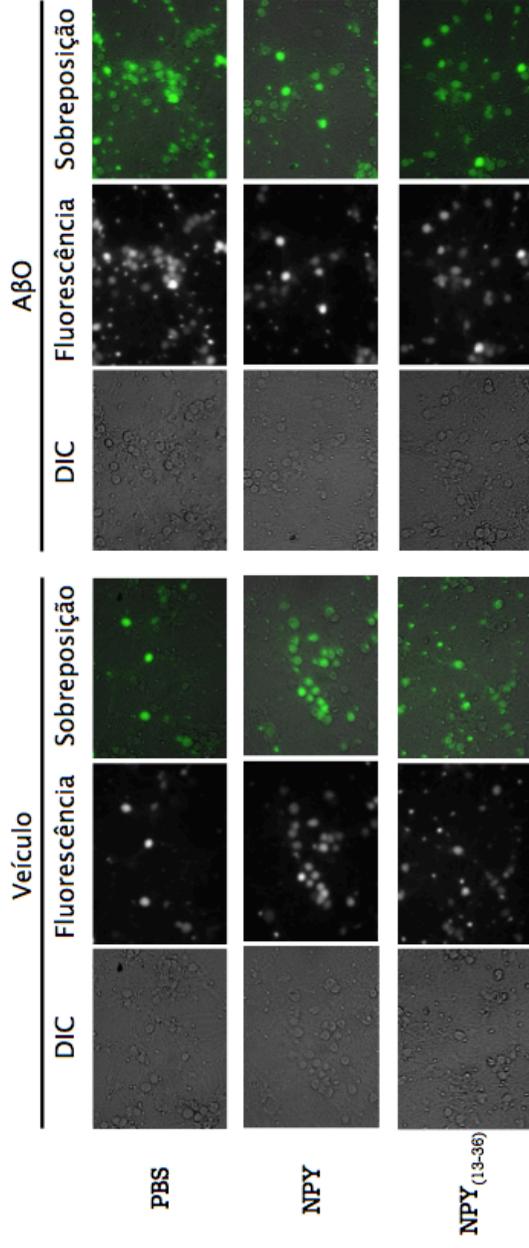
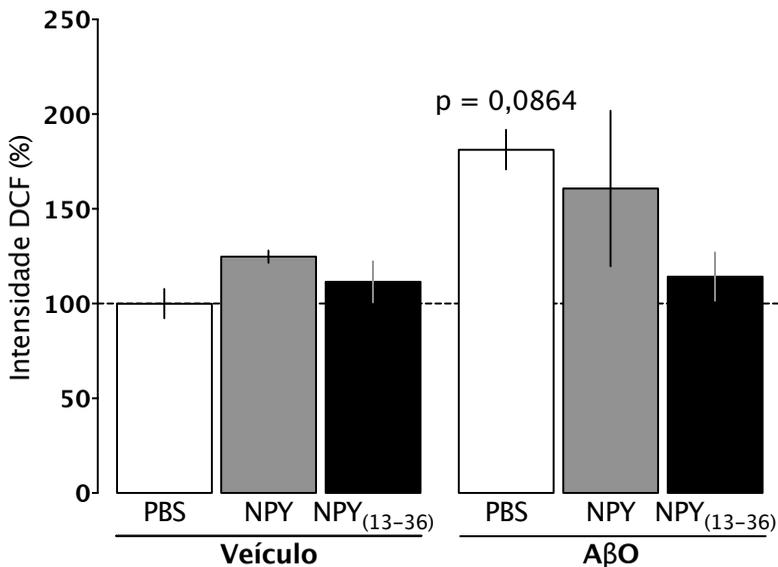


Figura 15. Efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ sobre a produção de ROS induzida por A β O *in vitro*.

b) Resultados da quantificação da fluorescência como média em relação (%) ao grupo controle (PBS + veículo). Valores representam média \pm EPM, n = 1 (triplicatas). Valor de p em relação ao grupo PBS + veículo, ANOVA com duas vias, pós-teste *Holm-Sidak*.



5. DISCUSSÃO

Em razão do aumento da longevidade e da diminuição da natalidade, praticamente todos os países vêm passando nas últimas duas décadas pelo fenômeno de envelhecimento populacional (UNITED NATIONS et al. 2013). Com isso, torna-se cada vez mais importante entender o que é um envelhecimento bem-sucedido. Esse conceito de difícil definição deve abranger aspectos multidisciplinares, desde uma boa saúde, com independência física, motora e manutenção da cognição, até aspectos psicológicos, como satisfação com a vida, participação social e crescimento pessoal (BOWLING; DIEPPE 2005).

A ciência vem tentando entender o envelhecimento através do estabelecimento de seus principais processos, seus pilares (LÓPEZ-OTÍN et al. 2013). O objetivo é estabelecer alvos para terapias antienvelhecimento que possam prevenir ou retardar o declínio fisiológico (motor, cognitivo e psicológico) associado à idade. É fato que o avanço da idade também aumenta a propensão a diversas doenças neurodegenerativas, sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento da DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2015).

Tanto no envelhecimento quanto na DA, há uma degeneração dos circuitos neuronais do neuropeptídeo Y, com diminuição dos níveis deste neuropeptídeo e de seus receptores em diversas áreas cerebrais importantes para cognição, emoção e funções motoras (CHAN-PALAY et al. 1985, 1986 e HIGUCHI et al. 1988 e MARTEL et al. 1990 e MARTIGNONI et al. 1992 e VEYRAT-DUREBEX et al. 2013). Isso sugere que a perda da neurotransmissão do NPY possa ser importante tanto no declínio cognitivo associado ao envelhecimento quanto nos prejuízos cognitivos observados na DA. Portanto, a restauração dos níveis do NPY e a ativação de seus receptores podem representar bons alvos para terapias em ambos os casos (BOTELHO; CAVADAS 2015 e DECRESSAC; BARKER 2012). De fato, os resultados deste trabalho corroboram essa hipótese.

Foi observado um prejuízo na memória espacial de curto prazo em camundongos C57BL/6 envelhecidos, com 11 meses de idade. Esse resultado está de acordo com o encontrado na literatura (KESBY et al. 2015 e MURAI et al. 2007), o que atesta para a robustez desse prejuízo associado ao envelhecimento no teste de localização de objetos em camundongos. O tratamento com uma única dose de NPY i.c.v. foi capaz de reverter esse prejuízo. Os mesmos animais que não eram capazes de realizar o teste, após o tratamento com NPY, passaram

apresentar preferência pelo objeto realocado, demonstrando serem capazes de perceber o reposicionamento do mesmo.

Em revisão (BOTELHO; CAVADAS 2015), foi proposto que o NPY é capaz de inibir ou retardar seis dos nove pilares do envelhecimento anteriormente propostos (LÓPEZ-OTÍN et al. 2013): perda da proteostase, exaustão de células-tronco, comunicação intercelular alterada, sensibilidade a nutrientes desregulada, senescência celular e disfunção mitocondrial. Entretanto, apesar dos benefícios do NPY durante o envelhecimento já apresentados na literatura, esse é o primeiro relato de melhora cognitiva. Esses dados indicam que a restauração dos níveis centrais de NPY pode representar um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias antienvhecimento e o tema merece ser investigado mais profundamente no futuro.

Contudo, o tratamento com NPY em camundongos C57BL/6 jovens parece ter prejudicado a memória espacial. Infelizmente, pelo desenho experimental empregado não é possível discernir o efeito do tratamento de um possível efeito da repetição do teste da realocação de objetos. É possível que a repetição tenha interferido no interesse dos animais pelo objeto realocado. Embora não tenha sido observada nenhuma diferença significativa nos tempos de exploração dos objetos entre os dois experimentos, houve uma queda na exploração do campo aberto durante a segunda sessão. Ao mesmo tempo, no mesmo teste com camundongos suíços jovens, o grupo que recebeu NPY e veículo foi capaz de reconhecer o reposicionamento do objeto tendo explorado significativamente por mais tempo o objeto realocado. Esses animais nunca haviam sido submetidos a essa tarefa, embora haviam sido previamente habituados no campo aberto. Houve, também, uma diminuição na exploração no campo aberto pelos camundongos suíços devido à repetição.

Esses dados fortalecem a hipótese de que a queda na exploração no campo aberto observada nos camundongos C57BL/6 com 2 e 11 meses de idade tratados com NPY seja devido ao efeito da repetição, e não do tratamento. Da mesma forma, esses dados em conjunto com os da literatura (FLOOD et al. 1987, 1989 e SANTOS et al. 2013) indicam que o prejuízo na memória espacial observado nos animais com 2 meses de idade tratados com NPY provavelmente tem maior influência da repetição, e consequente perda de interesse no objeto realocado pelos animais. Entretanto, são necessários mais experimentos com grupos independentes para que se possa descartar ou não a hipótese de que o tratamento com NPY tenha sido o responsável pelo prejuízo apresentado

pelos camundongos C57BL/6 com 2 meses de idade nesse teste de localização de objetos.

Em trabalho anterior (SANTOS et al. 2013), foi mostrado pelo nosso grupo de pesquisa que o NPY é capaz de prevenir os prejuízos cognitivos e melhorar o comportamento do tipo depressivo induzido por agregados do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos. Além disso, no mesmo trabalho, foi mostrado que esses efeitos do NPY são dependentes da ativação do receptor Y_2 , e, ao menos parcialmente, devidos a prevenção dos danos oxidativos induzidos pelos agregados de $A\beta_{1-40}$. No entanto, esses agregados fibrilares são observados em estágios mais tardios da DA, possivelmente, os oligômeros de β -amilóide ($A\beta$) são os iniciadores e principais agentes tóxicos nessa patologia (FERREIRA; KLEIN 2011 e FERREIRA et al. 2015). Por isso, foi investigado no presente trabalho os efeitos do pré-tratamento com NPY e com $NPY_{(13-36)}$, um agonista dos receptores Y_2 , sobre os danos induzidos pelo tratamento com $A\beta$ em modelos *in vitro* e *in vivo* da DA.

É sabido que os $A\beta$ são capazes de aumentar a produção de ROS *in vitro* (DE FELICE et al. 2007 e FIGUEIREDO et al. 2013). Neste trabalho, apesar do n pequeno, é possível observar uma tendência de aumento na geração de ROS promovida pelos $A\beta$. Mais do que isso, os níveis de ROS encontrados para o grupo de animais tratados com $NPY_{(13-36)}$ e $A\beta$ foram semelhantes ao grupo controle (PBS + veículo), sugerindo que a ativação dos receptores Y_2 para o NPY pode ser a responsável por prevenir o dano oxidativo induzido pelos $A\beta$ caso esse dado se confirme com o aumento do n.

Também é sabido que no modelo de injeção i.c.v. com $A\beta$ em camundongos há um prejuízo na memória de reconhecimento de curto prazo, evidenciado pelo teste de reconhecimento de objetos (FIGUEIREDO et al. 2013 e LEDO et al. 2013). Nossos resultados corroboram esses achados, o grupo de animais tratado com PBS e $A\beta$ não foi capaz de discriminar os objetos, explorando os objetos familiar e novo de maneira semelhante nesse teste. Da mesma forma, esse mesmo grupo explorou de maneira semelhante os objetos no teste de localização de objetos, revelando que os $A\beta$ também induzem um prejuízo na memória espacial de curto prazo em camundongos. Deve ser destacado que este é um resultado inédito para este modelo. Embora já tenha sido demonstrado em outros modelos da DA exista prejuízo de memória espacial (para revisão ver WEBSTER et al. 2014) e até neste mesmo teste (SANTOS et al. 2013), há uma carência de dados na literatura que demonstrem que os $A\beta$, sem a presença de outras espécies, são

suficientes para induzir prejuízos nesse tipo de memória. Portanto, esses resultados fortalecem a hipótese dos oligômeros de β -amilóide.

Corroborando os achados anteriores da literatura (SANTOS et al. 2013), o pré-tratamento com NPY foi capaz de prevenir os prejuízos na memória espacial de curto prazo também nesse modelo de injeção com A β O. Além disso, nesse trabalho foi mostrado que ele também é capaz de prevenir os prejuízos na memória de reconhecimento. A ativação do receptor Y_2 através do uso de seu agonista seletivo, NPY₍₁₃₋₃₆₎, foi suficiente para prevenir os prejuízos na memória espacial de curto prazo induzidos pelos A β O, sugerindo que a proteção promovida pelo NPY neste caso ocorra prioritariamente pela ativação de seus receptores Y_2 . No entanto, apesar do pré-tratamento com NPY₍₁₃₋₃₆₎ ter sido suficiente para prevenir esse prejuízo de memória espacial associado a injeção com A β O, o grupo de animais que recebeu NPY₍₁₃₋₃₆₎ e veículo não foi capaz de realizar a tarefa de localização de objetos. Esses resultados podem revelar um papel duplo na ativação dos receptores Y_2 em relação a esse tipo de memória: prejudicial se exacerbada numa situação fisiológica, porém positiva numa situação neuropatológica, como é o caso da toxicidade induzida por A β O.

Na DA há um quadro de neurodegeneração associado com a excitotoxicidade. Esse fenômeno é causado pela ativação excessiva dos NMDARs de glutamato, o que leva ao rompimento da homeostase de cálcio intracelular, ativação da síntese de óxido nítrico, geração de radicais livres e, finalmente, morte celular programada (para revisão ver DONG et al. 2009). Os A β O causam mudanças nos níveis e na distribuição dos receptores de glutamato, com consequentes prejuízos na plasticidade sináptica. Na base dessa deterioração sináptica está a superativação das vias glutamatérgicas (para revisão ver FERREIRA; KLEIN 2011), sendo a indução do aumento intracelular de cálcio e da formação de ROS pelos A β O mediada, ao menos parcialmente, pela ativação dos receptores de glutamato do subtipo NMDA (DE FELICE et al. 2007).

A ativação dos receptores Y_2 é capaz de inibir a liberação de glutamato (GREBER et al. 1994 e SILVA et al. 2001), tendo um efeito neuroprotetor em modelos de excitotoxicidade (DOMIN et al. 2006 e SILVA et al. 2003 e ŚMIAŁOWSKA et al. 2009). Portanto, é provável que a ativação dos receptores Y_2 esteja protegendo as sinapses contra os danos de excitotoxicidade e consequente formação de ROS induzidos pelos A β O, levando a melhora na memória espacial. Essa hipótese está de acordo com os resultados aqui mostrados *in vitro* e com o trabalho anterior de SANTOS et. al 2013, onde foi visto que a ativação desses receptores era necessária para a proteção promovida pelo NPY, e que

essa proteção se dava, ao menos em parte, pela prevenção dos danos oxidativos induzidos pelos agregados de $A\beta_{1-40}$.

Considerando também a importância da sinalização glutamatérgica para diversos processos fisiológicos, é possível que a ativação excessiva dos receptores Y_2 seja prejudicial na fisiologia e possa levar a prejuízos cognitivos em camundongos como os observados no grupo de animais que receberam NPY₍₁₃₋₃₆₎ e veículo. É válido ressaltar que camundongos *knockout* para este receptor também apresentam prejuízos na memória espacial e declarativa (REDROBE et al. 2004), sugerindo que há um fino balanço fisiológico na sinalização dos receptores Y_2 , e tanto o aumento quanto a diminuição exacerbados dessa ativação podem levar a prejuízos cognitivos.

No presente estudo, a ativação dos receptores Y_2 não foi suficiente para prevenir os prejuízos de memória declarativa de reconhecimento induzidos por $A\beta$ evidenciados pelo teste de reconhecimento de objetos. Esses resultados indicam que a proteção promovida pelo NPY nesse tipo de memória envolve a ativação de seus outros receptores, podendo haver ou não a necessidade da ativação conjunta do receptor Y_2 .

Ambos os testes de reconhecimento e localização de objetos baseiam-se na curiosidade inata do animal pela novidade, não havendo necessidade de emprego de reforços positivos ou negativos. Também não é necessário que o animal aprenda uma regra, com esses reforços moldando o aprendizado. Por isso, eles se assemelham as condições dos testes cognitivos empregados em humanos e primatas não-humanos, onde não há estímulos de fome ou choque, por exemplo (ENNACEUR; DELACOUR 1988 e ENNACEUR; MELIANI 1992 e LEGER et al. 2013 e MURAI et al. 2007).

Embora esses dois testes apresentem semelhanças, no reconhecimento de objetos, o julgamento é se o item é novo ou familiar, enquanto na localização de objetos, o julgamento é se o item havia sido previamente associado a outra localização. Portanto, esses dois testes avaliam tipos de memória diferentes, que por consequência, recrutam circuitos neuronais distintos. É amplamente descrito o envolvimento do córtex perirrinal, córtex pré-frontal medial, hipocampo e tálamo medial-dorsal nas memórias de reconhecimento. No entanto, atualmente considera-se que o teste de localização de objetos tem maior envolvimento do hipocampo, enquanto o teste de reconhecimento de objetos tenha grande envolvimento do córtex perirrinal (para revisão recente, ver WARBURTON; BROWN 2015).

A memória dos camundongos suíços também foi avaliada no teste de labirinto aquático que, por ser um teste de memória espacial, também tem grande envolvimento do hipocampo (MORRIS et al. 1986 e MORRIS 1984 e VORHEES; WILLIAMS 2006). No entanto, o grupo de animais tratados com PBS e A β O não apresentou prejuízo nesse teste durante a sessão de treinamento ou na sessão teste. Esse teste conta com a água (e o risco de afogamento) como estímulo negativo. Ele também contém uma etapa de muitas repetições (treinamento). É comumente aceito que a memória estabelecida em um único evento, como no teste de localização de objetos, é mais vulnerável do que a memória estabelecida em múltiplos treinos, como no labirinto aquático (ENNACEUR; DELACOUR 1988). Embora as duas memórias sejam do tipo espacial e muito dependentes do hipocampo, é possível que o teste de localização de objetos tenha uma sensibilidade maior ao dano cognitivo causado pelos A β O.

Por outro lado, os treinamentos do labirinto aquático iniciaram-se 11 dias após as injeções com PBS, NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e com veículo e A β O, e a sessão teste foi realizada já 15 dias após das mesmas. Espera-se que os prejuízos induzidos por uma única injeção i.c.v. com A β O em camundongos tenham um caráter agudo, e o longo intervalo após o tratamento em que os animais foram avaliados pode ter sido responsável por uma reversão espontânea dos prejuízos comportamentais e neuroquímicos (CLEARY et al. 2005 e FERREIRA et al. 2015 e FIGUEIREDO et al. 2013).

Nesse sentido, dados anteriores indicam que a injeção i.c.v. com A β O em camundongos é capaz de induzir um quadro de neuroinflamação, levando ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e ao recrutamento de micróglia e astrócitos dentro de 24 h (LEDO et al. 2013). Foram avaliadas nesse trabalho as quantidades de IBA-1 (proteína relacionada a ativação da micróglia) e de GFAP (proteína marcadora de astrócitos) presente no hipocampo dos animais 15 dias após as injeções com PBS, NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎ e com veículo ou A β O. No entanto, não foi possível observar aumento significativo na imunodeteção dessas proteínas no grupo tratado com PBS e A β O. Isso sugere que ocorra uma janela temporal de ativação das células gliais, e que, 15 dias após o tratamento com A β O, pode ter sido muito tardio para avaliar esse efeito.

Na verdade, essa é uma das limitações do modelo *in vivo* da DA utilizado neste estudo. A injeção i.c.v. com A β O em camundongos provoca prejuízos rapidamente, podendo ser observados até mesmo em 24 horas após a sua injeção (FIGUEIREDO et al. 2013 e LEDO et al.

2013), diferindo do curso da DA em humanos que apresenta anos de progressão até o seu diagnóstico (ALZHEIMER'S; ASSOCIATION 2015). Por isso, alguns autores especulam que os A β O podem disparar vias agudas de sinalizações no cérebro dos camundongos que não são importantes na patologia crônica nos humanos (FERREIRA et al. 2015). A injeção i.c.v. com A β O em primatas não-humanos recapitula mais fidedignamente a patologia progressiva da DA, com perda sináptica, recrutamento de células da glia e também o aparecimento de emaranhados neurofibrilares, marco histopatológico da doença. Esse poderia ser um bom modelo pré-clínico para avaliação de novas terapias para humanos (FORNY-GERMANO et al. 2014), porém, apresenta limitações éticas e financeiras.

O pré-tratamento com NPY₍₁₃₋₃₆₎ elevou os níveis da proteína IBA-1 detectados e, em conjunto com o tratamento com A β O, foi capaz de aumentar os níveis de GFAP. Esses resultados sugerem que a ativação do receptor Y₂ é capaz de influenciar os níveis de proteínas de células da glia, principalmente da micróglia, no hipocampo de camundongos.

Tem sido demonstrado que o NPY é capaz de modular a micróglia. Sendo expresso tanto por células da glia quanto por neurônios, ele medeia a comunicação funcional dos sistemas nervoso e imune e, por isso, foi postulado que ele pode ter ações inibitórias/neuroprotetoras na neuroinflamação (para revisão ver DECRESSAC; BARKER 2012 e MALVA et al. 2012). Mais especificamente em relação ao receptor Y₂, já foi demonstrado que ele está presente nas células da glia na retina de ratos (SANTOS-CARVALHO et al. 2013). Além disso, a ativação desses receptores é capaz de atenuar a ativação microglial em um modelo de excitotoxicidade induzida por metanfetamina no hipocampo de camundongos (GONÇALVES et al. 2012). Há uma carência ainda de informações na literatura sobre o tema, porém, os resultados disponíveis sugerem um possível envolvimento do receptor Y₂ em funções de comunicação celular e neuroinflamação com recrutamento da micróglia.

Além da memória, na DA um dos principais sintomas observados nos pacientes são as mudanças de humor, que incluem depressão e apatia (ALZHEIMER'S ASSOCIATION 2015). Dados recentes mostram que os A β O são capazes de induzir comportamentos do tipo depressivo no teste de nado forçado em camundongos (LEDO et al. 2013). De maneira importante, trabalho prévio do nosso laboratório indicou que o NPY foi capaz de prevenir os prejuízos emocionais induzidos por agregados de A β ₁₋₄₀ em camundongos (SANTOS et al.

2013). Por esta razão, os camundongos suíços foram avaliados no presente estudo em dois testes de comportamento emocional, o *splash* e o nado forçado.

O teste do *splash* avalia comportamentos associados a anedonia e apatia (MATHEUS et al. 2015 e (MORETTI et al. 2015). Os camundongos tratados com PBS e A β O responderam de maneira interessante, embora não diferentes estatisticamente do grupo controle, esse grupo revelou possuir duas subpopulações de mesmo n distintas por estarem acima ou abaixo da mediana do grupo nos parâmetros de latência e *grooming*. Comparando os resultados desses mesmos animais com o seu desempenho nos testes de memória, (reconhecimento e localização de objetos), não foi possível estabelecer qualquer correlação entre a existência de prejuízo emocional (ou não) e o desempenho cognitivo (dados não mostrados). Em relação aos efeitos dos pré-tratamentos com NPY ou NPY₍₁₃₋₃₆₎, embora eles tenham sido capazes de prevenir prejuízos de memória induzidos pelos A β O, nenhum desses pré-tratamentos pareceu prevenir as modificações observadas no teste do *splash* induzidas pelos A β O.

Não houve diferenças significativas entre nenhum dos grupos avaliados no teste de nado forçado. O resultado aqui encontrado para o grupo tratado com PBS e A β O contraria aqueles publicados anteriormente por LEDO et. al, 2013. Essa discrepância pode ser fruto de uma diferença metodológica no referido trabalho, incluindo o protocolo comportamental e os animais utilizados. Esses dados em conjunto sugerem que os A β O induziram modificações na cognição e na emoção por vias diferentes nos camundongos. Além disso, os animais apresentaram uma susceptibilidade distinta à injeção com A β O no que diz respeito a emocionalidade.

Foi também aferida a capacidade de discriminação olfatória dos camundongos suíços que receberam injeções i.c.v. com PBS, NPY, NPY₍₁₃₋₃₆₎ e com veículo ou A β O. Apenas o grupo que recebeu NPY e veículo foi incapaz de discriminar entre os dois compartimentos. Esses resultados sugerem que o NPY pode causar um prejuízo olfatório dependente da ativação de outros receptores que não o Y₂, já que a ativação desses receptores através de seu agonista, NPY₍₁₃₋₃₆₎, não foi suficiente para causar prejuízo semelhante.

Entretanto, essa tarefa tem um fator implícito de ansiedade que é desencadeada pelo animal ser exposto a um ambiente novo e grande em relação a sua gaiola de criação, e estar separado do seu grupo social (PRUT; BELZUNG 2003). Portanto, a preferência do animal pelo compartimento com odor familiar pode ser em grande parte devida a sua

ansiedade fisiológica. O NPY é ansiolítico quando administrado centralmente em roedores (HEILIG et al. 1989), e, portanto, poderia, através dessa propriedade, levar o grupo de animais tratados com NPY e veículo a perder a preferência pelo compartimento familiar sobre o não-familiar, o que não teria relação com a capacidade de discriminação olfatória. Portanto, outros experimentos de olfação, como de reconhecimento olfatório, seriam necessários para excluir totalmente o envolvimento da ansiedade nos resultados do presente estudo.

6. CONCLUSÃO

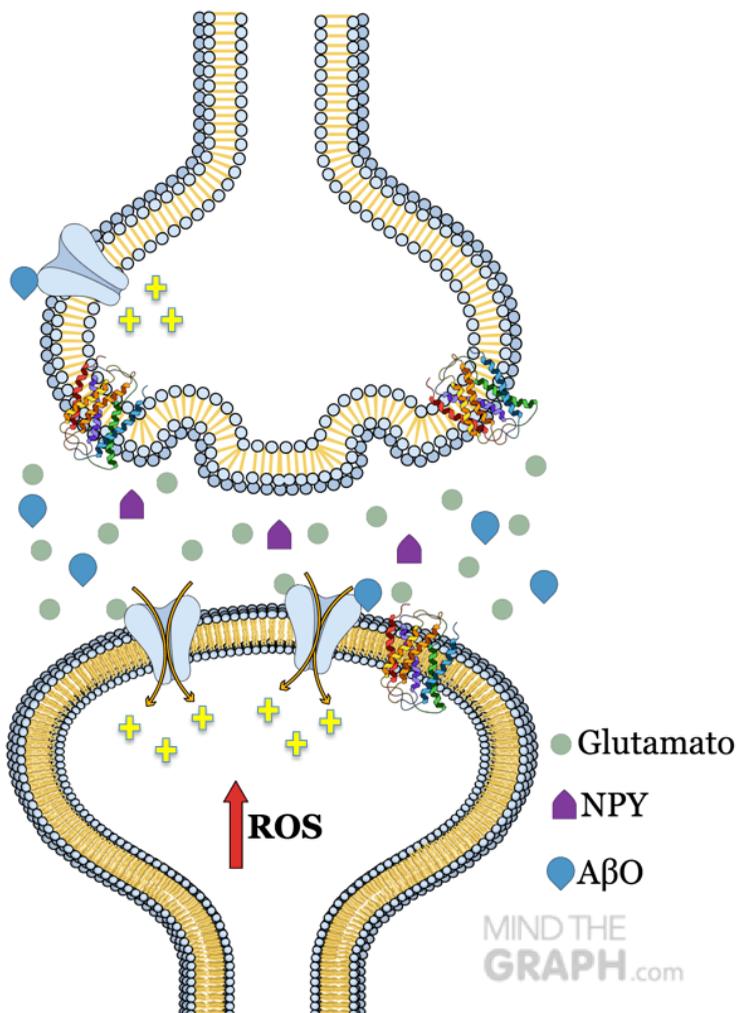
No presente trabalho, uma única injeção i.c.v. com NPY foi capaz de reverter o prejuízo de memória espacial associado ao envelhecimento em camundongos com 11 meses de idade avaliados no teste de localização de objetos. No modelo da DA induzido pela injeção i.c.v. com A β O, o pré-tratamento com NPY foi capaz de prevenir os prejuízos de memória de reconhecimento e espacial de curto prazo. A ativação dos receptores Y₂ através do seu agonista, NPY₍₁₃₋₃₆₎, mostrou-se suficiente para prevenção desses prejuízos na memória espacial, além disso, ela foi capaz de prevenir parcialmente a geração de ROS induzidas por A β O *in vitro*.

Entretanto, esses resultados também alertam para efeitos duais e o aparecimento de efeitos adversos após a ativação da neurotransmissão do NPY. A injeção i.c.v. com NPY prejudicou o desempenho de camundongos C57BL/6 jovens no teste de localização de objetos e a injeção i.c.v. com NPY₍₁₃₋₃₆₎ prejudicou o desempenho de camundongos suíços jovens no mesmo teste. Além disso, a injeção i.c.v. com NPY prejudicou a discriminação olfatória de camundongos suíços.

Em conjunto, os resultados desse trabalho corroboram nossa hipótese e indicam que a restauração dos níveis do NPY e a ativação de seus receptores Y₂ representam promissores alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos tratamentos para a prevenção do declínio cognitivo associado ao envelhecimento e observados nas fases iniciais sintomáticas da DA (**resumo gráfico**).

Figure 16. Resumo gráfico

Durante o envelhecimento e na DA há uma degeneração dos circuitos neuronais do NPY, com diminuição nos níveis do NPY e do receptor Y_2 em importantes áreas cerebrais para a memória, como o hipocampo. Os receptores Y_2 são acoplados a proteína G, pré-sinápticos, e sua ativação controla negativamente a liberação do glutamato. A diminuição da ativação desses receptores pode levar a um descontrole das transmissões excitatórias, principalmente no hipocampo. Na DA, os A β O agem nos canais de cálcio pré-sinápticos aumentando sua permeabilidade e contribuindo para uma maior liberação de glutamato e d-serina, um co-agonista dos receptores NMDA. Nos neurônios pós-sinápticos, os A β O podem interagir diretamente com os receptores glutamatérgicos contribuindo para sua alta excitabilidade. A super-ativação dos receptores de glutamato provoca um acentuado influxo de cátions e, de maneira importante, de cálcio no neurônio pós-sináptico. Esse fenômeno, conhecido como excitotoxicidade, leva ao rompimento da homeostase de cálcio intracelular, desregulação na sensibilidade a nutrientes, perda de proteostase, dano mitocondrial, aumento da formação de ROS, perda sináptica e, finalmente, morte celular programada. Esses danos celulares estão presentes e associados aos declínios cognitivos durante o envelhecimento e na DA. O reestabelecimento da sinalização do neuropeptídeo Y e da ativação dos receptores Y_2 pode controlar a liberação de glutamato e aliviar o quadro de excitotoxicidade, dessa forma, protegendo as sinapses e atenuando o declínio cognitivo associado a essas duas condições. Portanto, estratégias de intervenção com esses alvos devem ser focadas ao aparecimento dos primeiros sintomas cognitivos. Em estágio de declínio avançado, onde há extensa degeneração neuronal, já não é esperado que esse tipo de estratégia surta efeito. A ilustração seguinte foi gerada através do site www.mindthegraph.com.



REFERÊNCIAS

- ADRIAN, T. E.; ALLEN, J. M.; BLOOM, S. R.; et al. **NPY distribution in human brain**. *Nature*, v. 306, n. 8, p. 584–586, 1983.
- ALZHEIMER'S; ASSOCIATION. **Alzheimer ' s disease facts and figures**. *Alzheimer's & Dementia*, v. 11, n. 3, p. 332–384, 2015.
- ALZHEIMER, A. **Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde**. *Allg Zeits Psychi- atry Psychisch YGerichtlich Med*, v. 64, p. 146–8, 1907. DOI: <10.1002/ca.980080612>.
- AOKI, C.; PICKEL, V. **Neuropeptide Y in cortex and striatum**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. Part III. , n. Ultrastructural Distribution and Coexistence with Classical Neurotransmitters and Neuropeptides, p. 186–205, 1990.
- AVELEIRA, C. A.; BOTELHO, M.; CARMO-SILVA, S.; et al. **Neuropeptide Y stimulates autophagy in hypothalamic neurons**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, , n. 22, p. E1642–51, 2015. DOI: <10.1073/pnas.1416609112>.
- AVELEIRA, C. A.; BOTELHO, M.; CAVADAS, C. **NPY/neuropeptide Y enhances autophagy in the hypothalamus: a mechanism to delay aging?** *Autophagy*, , n. June 2015, p. 00–00, 2015. DOI: <10.1080/15548627.2015.1062202>.
- AZPURUA, J.; EATON, B. A. **Neuronal epigenetics and the aging synapse**. , v. 9, n. May, p. 1–7, 2015. DOI: <10.3389/fncel.2015.00208>.
- BELZUNG, C. **Measuring rodent exploratory behavior**. In: W. Crusio; R. T. Gerlai (Orgs.); *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)*. v. 13, p. 738–749, 1999. Elsevier Science.
- BOND, M.; ROGERS, G.; PETERS, J.; et al. **The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of technology appraisal no. 111): A systematic review and Economic model**. *Health Technology Assessment*, v. 16, n. 21, p. 1–469, 2012. DOI: <10.3310/hta16210>.
- BOTELHO, M.; CAVADAS, C. **Neuropeptide Y: An Anti-Aging Player?** *Trends in Neurosciences*, v. 38, n. 11, p. 701–711, 2015. Elsevier Ltd. DOI: <10.1016/j.tins.2015.08.012>.
- BOWLING, A.; DIEPPE, P. **What is successful ageing and who should**

define it?. *BMJ: British Medical Journal*, v. 331, n. 7531, p. 1548–1551, 2005. DOI: <10.1136/bmj.331.7531.1548>.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976. DOI: <10.1016/0003-2697(76)90527-3>.

BRICKMAN, A. M.; STERN, Y. **Aging and memory in humans**. *Encyclopedia of Neuroscience*, v. 1, p. 175–180, 2009. DOI: <10.1016/B978-008045046-9.00745-2>.

CABERLOTTO, L.; FUXE, K.; HURD, Y. L. **Characterization of NPY mRNA-expressing cells in the human brain: Co-localization with Y2 but not Y1 mRNA in the cerebral cortex, hippocampus, amygdala, and striatum**. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 20, p. 327–337, 2000. DOI: <10.1016/S0891-0618(00)00107-1>.

CAN, A.; DAO, D. T.; ARAD, M.; et al. **The mouse forced swim test**. *Journal of visualized experiments: JoVE*, n. 59, p. e3638, 2012. DOI: <10.3791/3638>. Acesso em: 11/9/2015.

CHAN-PALAY, V.; LANG, W.; ALLEN, Y. S.; HAESLER, U.; POLAK, J. M. II . **Cortical Neurons Immunoreactive With Antisera Against Neuropeptide Y Are Altered in Alzheimer ' s-Type Dementia**. *Journal of Comparative Neurology*, v. 238, p. 390–400, 1985.

CHAN-PALAY, V.; LANG, W.; HAESLER, U.; KOHLER, C.; YASARGIL, G. **Distribution of Altered Hippocampal Neurons and Axons Immunoreactive With Antisera Against Neuropeptide Y in Alzheimer ' s-Type Dementia**. *Journal of Comparative Neurology*, v. 248, p. 376–394, 1986.

CLARKE, J. R.; LYRA E SILVA, N. M.; FIGUEIREDO, C. P.; et al. **Alzheimer-associated A β oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation**. *EMBO molecular medicine*, v. 7, n. 2, p. 190–210, 2015. DOI: <10.15252/emmm.201404183>.

CLEARY, J. P.; WALSH, D. M.; HOFMEISTER, J. J.; et al. **Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function**. *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 1, p. 79–84, 2005. DOI: <10.1038/nm1372>.

COLMERS, W. F.; KLAPSTEIN, G. J.; FOURNIER, A.; ST-PIERRE, S.; TREHERNE, K. A. **Presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampal slice in vitro is mediated by a Y2 receptor**. *British journal of pharmacology*, v. 102, n. 1, p. 41–44, 1991.

CROCE, N.; CIOTTI, M. T.; GELFO, F.; et al. **Neuropeptide Y Protects Rat Cortical Neurons against β -Amyloid Toxicity and Re-establishes Synthesis and Release of Nerve Growth Factor.** ACS Chemical Neuroscience, v. 3, p. 312–318, 2012.

CROCE, N.; DINALLO, V.; RICCI, V.; et al. **Neuroprotective effect of neuropeptide Y against β -amyloid 25-35 toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with increased neurotrophin production.** Neuro-degenerative diseases, v. 8, n. 5, p. 300–9, 2011. DOI: <10.1159/000323468>.

CROCE, N.; GELFO, F.; TERESA, M. **NPY modulates miR-30a-5p and BDNF in opposite direction in an in vitro model of Alzheimer disease : a possible role in neuroprotection ?.** Mol Cell Biochem, v. 376, p. 189–195, 2013. DOI: <10.1007/s11010-013-1567-0>.

DARBON, H.; BERNASSAU, J. M.; DELEUZE, C.; et al. **Solution conformation of human neuropeptide Y by 1H nuclear magnetic resonance and restrained molecular dynamics.** European journal of biochemistry / FEBS, v. 209, n. 2, p. 765–771, 1992.

DECRESSAC, M.; BARKER, R. A. **Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair.** Experimental Neurology, v. 238, n. 2, p. 265–272, 2012. Elsevier Inc. DOI: <10.1016/j.expneurol.2012.09.004>.

DECRESSAC, M.; PRESTOZ, L.; VERAN, J.; et al. **Neuropeptide Y stimulates proliferation , migration and differentiation of neural precursors from the subventricular zone in adult mice.** Neurobiology of Disease, v. 34, n. 3, p. 441–449, 2009. Elsevier Inc. DOI: <10.1016/j.nbd.2009.02.017>.

DOMIN, H.; KAJTA, M.; GEMIAOWSKA, M. **Neuroprotective effects of MTEP , a selective mGluR5 antagonist and neuropeptide Y on the kainate-induced toxicity in primary neuronal cultures. , 2006.**

DONG, X.; WANG, Y.; QIN, Z. **Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases.** Acta pharmacologica Sinica, v. 30, n. 4, p. 379–87, 2009. SIMM & SJTU. DOI: <10.1038/aps.2009.24>.

DUMONT, Y.; JACQUES, D.; BOUCHARD, P.; QUIRION, R. **Species differences in the expression and distribution of the neuropeptide Y Y1, Y2, Y4, and Y5 receptors in rodents, guinea pig, and primates brains.** Journal of Comparative Neurology, v. 402, n. 3, p. 372–384, 1998. DOI: <10.1002/(SICI)1096-9861(19981221)402:3<372::AID-CNE6>3.0.CO;2-2>.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L.; et al. **Doencas Cronicas Nao Transmissiveis no Brasil: Prioridade para enfrentament e investigacao.** Revista de Saude Publica, v. 46, n. SUPPL.1, p. 126–134, 2012. DOI: <10.1590/S0034-89102012000700017>.

ENGELHARDT, E.; BRUCKI, S. M. T.; CAVALCANTI, J. L. S.; et al. **Tratamento da Doença de Alzheimer: Recomendações e sugestões do departamento científico de neurologia cognitiva do envelhecimento da academia brasileira de neurologia.** Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 63, n. 4, p. 1104–1112, 2005. DOI: <10.1590/S0004-282X2005000400034>.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. **A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data.** Behavioural Brain Research, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988. DOI: <10.1016/0166-4328(88)90157-X>.

ENNACEUR, A.; MELIANI, K. **A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory.** Behavioural Brain Research, v. 51, n. 1, p. 83–92, 1992. DOI: <10.1016/S0166-4328(05)80315-8>.

DE FELICE, F. G.; VELASCO, P. T.; LAMBERT, M. P.; et al. **Abeta Oligomers Induce Neuronal Oxidative Stress through an N-Methyl-D-aspartate Receptor-dependent Mechanism That Is Blocked by the Alzheimer Drug Memantine.** Journal of Biological Chemistry, v. 282, n. 15, p. 11590–11601, 2007. DOI: <10.1074/jbc.M607483200>.

FERREIRA, R.; SANTOS, T.; VIEGAS, M.; et al. **Neuropeptide Y inhibits interleukin-1 b -induced phagocytosis by microglial cells.** Journal of Neuroinflammation, v. 8, n. 1, p. 169, 2011. BioMed Central Ltd. DOI: <10.1186/1742-2094-8-169>.

FERREIRA, R.; XAPELLI, S.; SANTOS, T.; et al. **Neuropeptide Y Modulation of Interleukin-1 β (IL-1 β) -induced Nitric Oxide Production in Microglia *.** The Journal of biological chemistry, v. 285, n. 53, p. 41921–41934, 2010. DOI: <10.1074/jbc.M110.164020>.

FERREIRA, S. T.; KLEIN, W. L. **The Ab oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer ' s disease.** Neurobiology of Learning and Memory, v. 96, n. 4, p. 529–543, 2011. Elsevier Inc. DOI: <10.1016/j.nlm.2011.08.003>.

FERREIRA, S. T.; LOURENCO, M. V; OLIVEIRA, M. M.; FELICE, F. G. DE. **Soluble amyloid- b oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer ' s disease. ,** v. 9, n. May, p. 1–17, 2015. DOI: <10.3389/fncel.2015.00191>.

FIGUEIREDO, C. P.; CLARKE, J. R.; LEDO, J. H.; et al. **Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular-weight $\text{A}\beta$ oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular-weight oligomers.** The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 33, n. 23, p. 9626–34, 2013. DOI: <10.1523/JNEUROSCI.0482-13.2013>.

FLOOD, J. F.; BAKER, M. L.; HERNANDES, E. N.; MORLEY, J. E. **Modulation of memory processing by neuropeptide Y varies with brain injection site.** Brain research, v. 503, p. 73–82, 1989. DOI: <10.1016/0006-8993(87)91297-2>.

FLOOD, J. F.; HERNANDEZ, E. N.; MORLEY, J. E. **Modulation of memory processing by neuropeptide Y.** Brain research, v. 421, p. 280–290, 1987. DOI: <10.1016/0006-8993(87)91297-2>.

FORNY-GERMANO, L.; LYRA E SILVA, N. M.; BATISTA, A. F.; et al. **Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid- β oligomers in nonhuman primates.** The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 34, n. 41, p. 13629–43, 2014. DOI: <10.1523/JNEUROSCI.1353-14.2014>.

GONÇALVES, J.; RIBEIRO, C. F.; MALVA, J. O.; SILVA, A. P. **Protective role of neuropeptide Y Y_2 receptors in cell death and microglial response following methamphetamine injury.** The European journal of neuroscience, v. 36, n. 9, p. 3173–83, 2012. DOI: <10.1111/j.1460-9568.2012.08232.x>.

GREBER, S.; SCHWARZER, C.; SPERK, G. **Neuropeptide Y inhibits potassium-stimulated glutamate release through Y_2 receptors in rat hippocampal slices in vitro.** British journal of pharmacology, v. 113, n. 3, p. 737–740, 1994. DOI: <10.1111/j.1476-5381.1994.tb17055.x>.

HAASS, C.; SELKOE, D. J. **Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide.** Nature reviews. Molecular cell biology, v. 8, n. 2, p. 101–12, 2007. Nature Publishing Group. DOI: <10.1038/nrm2101>.

HALEY, T. J.; MCCORMICK, W. G. **Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse.** British journal of pharmacology and chemotherapy, v. 12, n. 1, p. 12–15, 1957. DOI: <10.1111/j.1476-5381.1957.tb01354.x>.

HANSEL, D. E.; EIPPER, B. A.; RONNETT, G. V. **Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor.** Letters to Nature, v. 410, n. 6831, p. 940–944, 2001. DOI: <10.1038/35073601>.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. **Alzheimer ' s Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis.** , , n. 6, p. 3–4, 1992.

HEILIG, M.; SÖDERPALM, B.; ENGEL, J. A.; WIDERLÖV, E. **Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models.** *Psychopharmacology*, v. 98, n. 4, p. 524–529, 1989. DOI: <10.1007/BF00441953>.

HERRUP, K. **The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis.** *Nat Neurosci*, v. 18, n. 6, p. 794–799, 2015. DOI: <10.1038/nn.4017>.

HIGUCHI, H.; YANG, H. Y.; COSTA, E. **Age-related bidirectional changes in neuropeptide Y peptides in rat adrenal glands, brain, and blood.** *Journal of neurochemistry*, v. 50, n. 0, p. 1879–1886, 1988.

HOWELL, O. W.; DOYLE, K.; GOODMAN, J. H.; et al. **Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus.** *Journal of Neurochemistry*, v. 93, n. 3, p. 560–570, 2005. DOI: <10.1111/j.1471-4159.2005.03057.x>.

KEIRE, D. A.; BOWERS, C. W.; SOLOMON, T. E.; REEVE, J. R. **Structure and receptor binding of PYY analogs.** *Peptides*, v. 23, n. 2, p. 305–321, 2002. DOI: <10.1016/S0196-9781(01)00602-7>.

KESBY, J. P.; KIM, J. J.; SCADENG, M.; et al. **Spatial Cognition in Adult and Aged Mice Exposed to High-Fat Diet.** *Plos One*, v. 10, n. 10, p. e0140034, 2015. DOI: <10.1371/journal.pone.0140034>.

KUMAR, A. **NMDA Receptor Function During Senescence: Implication on Cognitive Performance.** *Frontiers in Neuroscience*, v. 9, n. December, p. 1–15, 2015. DOI: <10.3389/fnins.2015.00473>.

LAMBERT, M. P.; BARLOW, A. K.; CHROMY, B. A.; et al. **Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 11, p. 6448–53, 1998. DOI: <10.1073/pnas.95.11.6448>.

LAURSEN, S. E.; BELKNAP, J. K. **Intracerebroventricular injections in mice: Some Methodological refinements.** *Journal of Pharmacological Methods*, v. 16, p. 355–357, 1986.

LEDO, J. H.; AZEVEDO, E. P.; CLARKE, J. R.; et al. **Amyloid- β oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice.** *Molecular psychiatry*, v. 18, n. 10, p. 1053–4, 2013. Nature Publishing Group. DOI: <10.1038/mp.2012.168>.

LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; et al. **Object recognition**

test in mice. Nature Protocols, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013. DOI: <10.1038/nprot.2013.155>.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M. **The Hallmarks of Aging.** Cell, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 2013. DOI: <10.1016/j.cell.2013.05.039.The>.

LUE, L.-F.; KUO, Y.-M.; ROHER, A. E.; et al. **Soluble Amyloid beta Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer’s Disease.** The American Journal of Pathology, v. 155, n. 3, p. 853–862, 1999. DOI: <10.1016/S0002-9440(10)65184-X>.

MALVA, J. O.; XAPELLI, S.; BAPTISTA, S.; et al. **Neuropeptides Multifaces of neuropeptide Y in the brain – Neuroprotection , neurogenesis and neuroinflammation.** Neuropeptides, v. 46, n. 6, p. 299–308, 2012. Elsevier Ltd. DOI: <10.1016/j.npep.2012.09.001>.

MARTEL, J. C.; ALAGAR, R.; ROBITAILLE, Y.; QUIRION, R. **Neuropeptide Y receptor binding sites in human brain. Possible alteration in Alzheimer’s disease.** Brain research, v. 519, p. 228–35, 1990. DOI: <10.1016/0006-8993(90)90082-M>.

MARTIGNONI, E.; BLANDINI, F.; PETRAGLIA, F.; et al. **Cerebrospinal fluid norepinephrine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and neuropeptide Y levels in Parkinson’s disease, multiple aystem atrophy and dementia of the Alzheimer type.** Journal of Neural Transmission, v. 4, p. 191–205, 1992.

MATHEUS, F. C.; RIAL, D.; REAL, J. I.; et al. **Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats.** Molecular Neurobiology, 2015. DOI: <10.1007/s12035-015-9330-z>.

MCLEAN CA; CHERNY, R.; FRASER FW; et al. **Soluble Pool of Abeta Amyloid as a Determinant of Severity of Neurodegeneration in Alzheimer’s Disease.** Annals of neurology, v. 46, n. 6, p. 860–866, 1999.

MICHEL, M. C.; BECK-SICKINGER, A.; COX, H.; et al. **XVI . International Union of Pharmacology Recommendations for the Nomenclature of Neuropeptide Y , Peptide YY , and Pancreatic Polypeptide Receptors. ,** v. 50, n. 1, p. 143–150, 1998.

MORETTI, M.; NEIS, V. B.; MATHEUS, F. C.; et al. **Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+)).** Neurotoxicity research, v. 28, n. 3, p. 222–31, 2015. DOI: <10.1007/s12640-015-9540-1>.

MORRIS, R. **Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.** Journal of neuroscience methods, v. 11, n. 1, p. 47–60, 1984.

MORRIS, R. G.; HAGAN, J. J.; RAWLINS, J. N. **Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the “spatial mapping” and “working memory” theories of hippocampal function.** 1986.

MULLER, U.; WINTER, P.; GRAEBER, M. B. **A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer’s disease: Revisited.** The Lancet Neurology, v. 12, n. 2, p. 129–130, 2013. Elsevier Ltd. DOI: <10.1016/j.jalz.2014.06.005>.

MURAI, T.; OKUDA, S.; TANAKA, T.; OHTA, H. **Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies.** Physiology and Behavior, v. 90, n. 1, p. 116–124, 2007. DOI: <10.1016/j.physbeh.2006.09.013>.

MUSIEK, E. S.; HOLTZMAN, D. M. **Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen”.** Nat Neurosci, v. 18, n. 6, p. 800–806, 2015. DOI: <10.1038/nn.4018>.

PARKER, S. L.; BALASUBRAMANIAM, A. **Neuropeptide Y Y2 receptor in health and disease.** British journal of pharmacology, v. 153, n. 3, p. 420–31, 2008. DOI: <10.1038/sj.bjp.0707445>.

PARSONS, C. G.; DANYSZ, W.; DEKUNDY, A.; PULTE, I. **Memantine and cholinesterase inhibitors: complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer’s disease.** Neurotoxicity research, v. 24, n. 3, p. 358–69, 2013. DOI: <10.1007/s12640-013-9398-z>.

PATEL, D.; PATEL, N. **Review of NPY and NPY receptor for obesity.** The Internet Journal of Pharmacology, v. 8, n. 2, 2009.

PAULA, V. D. J. R. DE; GUIMARÃES, F. M. **Neurobiological pathways to Alzheimer’s disease Amyloid-beta, Tau protein or both? .** v. 3, n. 3, p. 188–194, 2009.

PETERS, R. **Ageing and the brain.** Postgraduate Medical Journal, v. 82, n. 964, p. 84–88, 2006. DOI: <10.1136/pgmj.2005.036665>.

VAN DEN POL, A. N. **Neuropeptide transmission in brain circuits.** Neuron, v. 76, n. 1, p. 98–115, 2012. DOI: <10.1016/j.neuron.2012.09.014>.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. **Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.** Nature, v. 266, n.

5604, p. 730–2, 1977.

PREDIGER, R. D. S.; AGUIAR, A. S.; ROJAS-MAYORQUIN, A. E.; et al. **Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease.** *Neurotoxicity Research*, v. 17, p. 114–129, 2010. DOI: <10.1007/s12640-009-9087-0>.

PRUT, L.; BELZUNG, C. **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review.** *European Journal of Pharmacology*, v. 463, n. 1-3, p. 3–33, 2003. DOI: <10.1016/S0014-2999(03)01272-X>.

RAMOS, B.; BAGLIETTO-VARGAS, D.; CARLOS, J.; et al. **Early neuropathology of somatostatin / NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 × APP transgenic model of Alzheimer's disease.** *Neurobiology of aging*, v. 27, p. 1658–1672, 2006. DOI: <10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.022>.

REDROBE, J. P.; DUMONT, Y.; HERZOG, H.; QUIRION, R. **Characterization of neuropeptide Y, Y(2) receptor knockout mice in two animal models of learning and memory processing.** *Journal of molecular neuroscience*, v. 22, p. 159–166, 2004. DOI: <10.1385/JMN:22:3:159>.

ROSE, J. B.; CREWS, L.; ROCKENSTEIN, E.; et al. **Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a transgenic model of Alzheimer's disease.** *The Journal of neuroscience*, v. 29, n. 4, p. 1115–1125, 2009. DOI: <10.1523/JNEUROSCI.4220-08.2009>.

SANTOS-CARVALHO, A.; AVELEIRA, C. A.; ELVAS, F.; AMBRÓSIO, A. F.; CAVADAS, C. **Neuropeptide Y receptors Y1 and Y2 are present in neurons and glial cells in rat retinal cells in culture.** *Investigative ophthalmology & visual science*, v. 54, n. 1, p. 429–443, 2013. DOI: <10.1167/iovs.12-10776>.

SANTOS, V.; SANTOS, D.; LACH, G.; et al. **Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior , spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid-beta (A-beta 1 – 40) administration in mice.** *Behavioural Brain Research*, v. 244, p. 107–115, 2013. Elsevier B.V. DOI: <10.1016/j.bbr.2013.01.039>.

SILVA, A. P.; CARVALHO, A. P.; CARVALHO, C. M.; MALVA, J. O. **Modulation of intracellular calcium changes and glutamate release by neuropeptide Y1 and Y2 receptors in the rat hippocampus: Differential effects in CA1, CA3 and dentate gyrus.** *Journal of Neurochemistry*, v. 79,

n. 2, p. 286–296, 2001. DOI: <10.1046/j.1471-4159.2001.00560.x>.

SILVA, A. P.; PINHEIRO, P. S.; CARVALHO, C. M.; ZIMMER, J. **Acitvation of neuropeptide Y receptors in neuroprotective againts excitotoxicity in organotypin hippocampal slice cultures.** The FASEB Journal, v. 6, n. 3, 2003.

ŚMIAŁOWSKA, M.; DOMIN, H.; ZIEBA, B.; et al. **Neuroprotective effects of neuropeptide Y-Y2 and Y5 receptor agonists in vitro and in vivo.** Neuropeptides, v. 43, p. 235–249, 2009. DOI: <10.1016/j.npep.2009.02.002>.

STELZMANN, R. A.; SCHNITZLEIN, H. N.; MURTAGH, F. R. **An English translation of Alzheimer’s 1907 paper, “über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde”.** Clinical Anatomy, v. 8, n. 6, p. 429–431, 1995. DOI: <10.1002/ca.980080612>.

STÜRZENBAUM SR, K. P. **Control genes in quantitative molecular biological techniques.** Comparative Biochemistry and Physiology, v. Part B, n. 130, p. 281–289, 2001.

TATEMOTO, K. **Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 79, n. 18, p. 5485–5489, 1982. DOI: <10.1073/pnas.79.18.5485>.

TATEMOTO, K.; CARLQUIST, M.; MUTT, V. **Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide.** Nature, v. 296, n. 5858, p. 659–60, 1982.

UNITED NATIONS, U.; DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, D.; POPULATION DEVISION, D. **World Population Ageing 2013.** 2013.

VEYRAT-DUREBEX, C.; QUIRION, R.; FERLAND, G.; DUMONT, Y.; GAUDREAU, P. **Aging and long-term caloric restriction regulate neuropeptide Y receptor subtype densities in the rat brain.** Neuropeptides, v. 47, n. 3, p. 163–169, 2013. Elsevier Ltd. DOI: <10.1016/j.npep.2013.01.001>.

VORHEES, C. V; WILLIAMS, M. T. **Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory.** Nature Protocols, v. 1, n. 2, p. 848–858, 2006. DOI: <10.1038/nprot.2006.116.>.

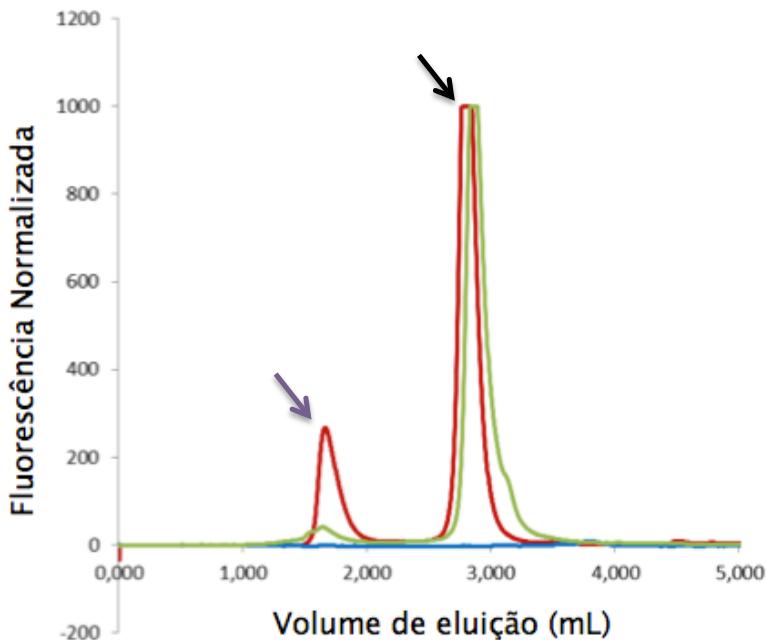
WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. **Neural circuitry for rat recognition memory.** Behavioural Brain Research, v. 285, p. 131–139, 2015. Elsevier B.V. DOI: <10.1016/j.bbr.2014.09.050>.

WEBSTER, S. J.; BACHSTETTER, A. D.; NELSON, P. T.; SCHMITT, F. A.; VAN ELDIK, L. J. **Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models.** *Frontiers in genetics*, v. 5, n. April, p. 88, 2014. DOI: <10.3389/fgene.2014.00088>.

WOOK YOO, S.; HAN, C. E.; SHIN, J. S.; et al. **A Network Flow-based Analysis of Cognitive Reserve in Normal Ageing and Alzheimer's Disease.** *Scientific reports*, v. 5, p. 10057, 2015. Nature Publishing Group. DOI: <10.1038/srep10057>.

YULYANINGSIH, E.; ZHANG, L.; HERZOG, H.; SAINSBURY, A. **NPY receptors as potential targets for anti-obesity drug development.** *British Journal of Pharmacology*, v. 163, n. 6, p. 1170–1202, 2011. DOI: <10.1111/j.1476-5381.2011.01363.x>.

ANEXO A



Anexo A. Perfil cromatográfico padrão para amostras de AβO.

Perfil cromatográfico obtido para as amostras de AβO (curva em vermelho) e de veículo (curva em azul) utilizados nesse trabalho. A curva em verde representa uma amostra do peptídeo Aβ *scrambled* submetido ao mesmo processo de oligomerização dos AβO. A seta roxa representa o pico de oligômeros de baixo peso molecular, enquanto a seta preta representa o pico de oligômeros de alto peso molecular (FIGUEIREDO et al. 2013). Todas as amostras foram preparadas em PBS. A coluna utilizada foi de exclusão de tamanho, GPC 100, fase móvel também PBS e volume de injeção 15 µl, manual.