UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

TIAGO GUARDIA DE SOUZA E SILVA

Avaliação de efeitos neuroprotetores e comportamentais do tratamento com geleia real em ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica.

São Paulo
2017

TIAGO GUARDIA DE SOUZA E SILVA

Avaliação de efeitos neuroprotetores e comportamentais do tratamento com geleia real em ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Profa. Dra Maria Regina Lopes Sandoval

Versão Corrigida

**São Paulo
2017**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Silva, Tiago Guardia de Souza e.

Avaliação de efeitos neuroprotetores e comportamentais do tratamento com geleia real em ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica / Tiago Guardia de Souza e Silva; orientadora Maria Regina Lopes Sandoval. -- São Paulo, 2017.

143 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Doença de Alzheimer 2. Geléia real 3. Neuroproteção 4. Neurogênese 5. Aprendizagem 6. Memória I. Título.

RC523

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVA, TIAGO GUARDIA DE SOUZA E

Título: Avaliação de efeitos neuroprotetores e comportamentais do tratamento com geleia real em ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, Fonte da Vida, e aos que a Ela buscam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus Pai Mãe Vida Consciência pela existência e oportunidade de desfrutar a Vida.

À minha esposa Karen Roedel por todo amor, companheirismo, amizade e alegria que vivenciamos diariamente. Agora somos uma Happy Family! Seu apoio, compreensão e incentivo oferecidos em tantas e tantas horas foram essenciais para que eu conseguisse chegar até aqui. Como é bom ter você ao meu lado na estrada da vida!!!

Aos meus pais José Evanildo da Silva e Maria Teresa Guardia de Souza e seus respectivos companheiros Wilma Conceição e Marco Roma por todo amor, amizade, exemplos, apoio e incentivo dados ao longo da vida.

À minha orientadora prof^a. Dra. Maria Regina Lopes Sandoval pela confiança e oportunidade de realização deste projeto de pesquisa. Agradeço por todos os ensinamentos e orientações ao longo deste percurso. Desejo que este nosso projeto de pesquisa possa gerar bons frutos. Além de todos os aprendizados obtidos, me sinto feliz pela amizade construída.

Ao prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto (ICB-USP) por toda colaboração, conselhos e disponibilidade do laboratório para realização das análises histológicas.

Ao prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier (IB-USP) por toda colaboração e orientação no delineamento experimental dos testes comportamentais.

Ao prof^a. Dra. Solange Castro Afeche (Lab. Farmacologia - Instituto Butantan) pela colaboração com as sugestões dadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dr. André Frazão Helene (IB-USP) e Dr. José Cipolla Neto (ICB-USP) por todas contribuições realizadas durante o exame de qualificação e esclarecimentos durante o processo de elaboração da dissertação.

À toda equipe de funcionários e pesquisadores do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan. Em especial, agradeço à Elisa por me acompanhar de perto nas atividades do dia-a-dia, me auxiliando nos experimentos, ensinando coisas e cultivando a amizade com conversas descontraídas. À Andrea por todo auxílio e explicações que me guiaram quando cheguei no laboratório, e também pelo apoio sempre oferecidos. À Renata, Otacília, seu Antônio e a todos que também me auxiliaram em momentos significativos.

À todos os alunos do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan. Apreendi um pouco com cada um, e também me diverti bastante. Lucas, Emídio, Adriana, Natália, Ana Letícia, Camila, Jeferson, Rafaela, Roberta, Marcelo, Rodrigo, Patrícia, Thalma, Marianas, Karina, e Élbio, agradeço por cada apoio nos momentos que precisei de auxílio. Poder fazer este trabalho ao lado de vocês foi divertido e além de tudo fiz mais amigos.

À todas as pessoas, estudantes, funcionários e colaboradores do Laboratório de Neurobiologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Em

especial agradeço ao Adilson por todo o auxílio com os experimentos e demonstração clara de que é possível se divertir enquanto se trabalha forte no laboratório.

À toda minha família, e em especial meu irmão Gustavo Guardia e minha madrinha Maria Antonieta por todo apoio e incentivo.

À todos os meus amigos que de uma forma mais próxima, ou mais distante enriquecem a minha vida com companheirismo e amizade sincera.

À José Gabriel da Costa, o mestre Gabriel, por todos os ensinamentos que clareiam a visão do caminho e inspirações para a realização deste trabalho.

À todos os amigos, meus irmãos e irmãs queridos(as), do Núcleo Espiritual Rosa de Luz e Associação Beneficente Luz de Salomão. A Força e a Luz de nossa União geram um poder incomensurável de despertar e realização. Como é bom estarmos juntos celebrando a vida e tudo o que é de bom. O apoio e incentivo de vocês com certeza foram fundamentais para manter meus passos firmes quando a subida ficou íngreme.

Ao meu grande amigo, irmão, brother, Doca (Alexandre Buchner) por estar ao meu lado na Jornada Apis, me possibilitando alcançar níveis os quais sozinho são impossíveis de vislumbrar.

Ao meu amigo e querido irmão Lucas Montanari (Tuti) por trazer a mensagem Apis (em formas de grãos de pólen), a qual me permitiu conhecer o maravilhoso universo das abelhas, e, consequentemente chegar a realizar este trabalho.

À querida amiga Aparecida Oliveira pelas orações e vibrações positivas.

À especialíssima Ângela Weiss pela amizade, incentivo, vibrações e mensagens que me auxiliam e inspiram.

Ao querido amigo Carlos Eduardo (irmãozão), meu mestre na arte ciência do uso terapêutico dos produtos das abelhas (apiterapia) em prol da saúde humana. Grato pela amizade, confiança, ensinamentos e apoio. Que a sabedoria da natureza continue nos inspirando!

Ao amigo Celso, mestre na arte ciência da apicultura. Grato por todos os ensinamentos e pelo nobre serviço de nos ter fornecido uma geleia real de excelente qualidade, a qual foi utilizada neste presente trabalho.

À todos que sonham, e ousam transformar os sonhos em realidade. Esta atitude é Fonte de Inspiração para mim e para o mundo.

À CAPES e Fundação Butantan pelo apoio financeiro ao projeto.

“Buscai em primeiro lugar o reino de Deus e a sua justiça, e as demais coisas vos serão acrescentadas”.

Jesus Cristo (Bíblia, Mateus 6:33)

“Eu faço parte dos que pensam que a ciência é belíssima. Um estudioso no laboratório não é apenas um técnico, ele também é uma criança confrontada a fenômenos naturais que a impressionam como um conto de fadas”.

Marrie Currie

RESUMO

A doença de Alzheimer (AD) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pelo declínio progressivo da função cognitiva. Esta é a maior causa de demência, sendo que a grande maioria dos casos da AD é do tipo esporádica (SAD), a qual tem como principal fator de risco o envelhecimento. A injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (icv-STZ) tem sido utilizada como modelo experimental da SAD em roedores e representa uma promissora ferramenta para análises etiopatogênicas e avaliação de novas propostas terapêuticas para a AD. O modelo icv-STZ mostra muitos aspectos das anormalidades da SAD, produzindo decréscimo no metabolismo cerebral de glicose e energia, prejuízo cognitivo, estresse oxidativo, astrogliose, perda neuronal e angiopatia amiloide. A geleia real (GR), substância produzida pelas abelhas operárias da espécie *Apis mellifera*, vem sendo popularmente utilizada há mais de 30 anos em áreas relacionadas à alimentação saudável e medicina natural. Pesquisas apontam que a GR possui uma série de atividades farmacológicas, incluindo ação neuroprotetora, antioxidante, anti-inflamatória e melhora da função cognitiva. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do tratamento oral prolongado com geleia real em ratos Wistar submetidos ao modelo icv-STZ sobre o aprendizado e memória, e na neuroproteção, esta avaliada pela neurogênese, neurodegeneração e estresse oxidativo. A injeção icv-STZ utilizada neste trabalho induziu efeitos deletérios no hipocampo de ratos, sendo estes representados por déficit cognitivo avaliado no labirinto aquático de Morris, e desenvolveu acentuada neurodegeneração, além da redução da neurogênese e aumento do estresse oxidativo. Por outro lado, a administração oral prolongada da GR foi capaz de induzir efeitos benéficos em animais lesionados pela injeção icv-STZ, ampliando o tempo de retenção da memória espacial operacional dos animais, reduzindo a neurodegeneração, aumentando a proliferação de novos neurônios e reduzindo o nível de estresse oxidativo na região do giro denteado do hipocampo. Assim, a Geleia Real mostrou efeitos benéficos em funções cognitivas e uma ação neuroprotetora no modelo experimental de AD esporádica.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive decline in cognitive function. This is the major cause of dementia and the sporadic AD (SAD) represents the majority of cases which aging is the main risk factor. Intracerebroventricular injection of Streptozotocin (icv-STZ) has been used as an experimental model of SAD in rodents and represents a promising tool for etiopathogenic analysis and evaluation of new therapeutic proposals for AD. The icv-STZ model shows many aspects of SAD abnormalities, resulting in decreased brain glucose and energy metabolism, cognitive impairment, oxidative stress, astrogliosis, neuronal loss, and amyloid angiopathy. Royal jelly (RJ), a substance produced by worker honeybees of the *Apis mellifera* species, has been popularly used for more than 30 years in areas related to healthy eating and natural medicine. Researches indicate that RJ has a series of pharmacological activities, including neuroprotective, antioxidant, anti-inflammatory action and improvement of cognitive function. The objective of this study was to investigate the effects of long-term oral treatment with royal jelly in Wistar rats submitted to the icv-STZ on working memory version of the Morris' water maze task and neuroprotection, evaluated by neurogenesis, neurodegeneration and oxidative stress. In this work, the icv-STZ injection induced deleterious effects in the hippocampus, which were represented by cognitive impairments, and developed marked neurodegeneration, besides the reduction of neurogenesis and increased oxidative stress. On the other hand, RJ long-term oral administration was able to induce beneficial effects in animals lesioned by icv-STZ injection, increasing the retention time on working spatial memory, reducing neurodegeneration and oxidative stress level and increasing the proliferation of new neurons in the hippocampus. Thus, Royal Jelly showed beneficial effects on cognitive functions and a neuroprotective action in the STZ experimental model of sporadic AD.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – A identificação da doença de Alzheimer. (A) Alois Alzheimer. (B) O primeiro caso: Auguste Deter

Figura 2 – Principais manifestações patológicas da doença de Alzheimer – marcações histológicas – placas amilóides extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares

Figura 3 – Esquema do processamento da memória

Figura 4 – Localização do hipocampo de ratos

Figura 5 - Conectividade, circuitos e organização regional e laminar da formação hipocampal

Figura 6 – Nichos neurogênicos do cérebro de ratos: zona sub-ventricular dos ventículos laterais – ZSV e zona sub-granular do giro denteado do hipocampo

Figura 7 – Linha do tempo do processo neurogênico contendo características morfofisiológicas de cada etapa celular.

Figura 8 – Abelhas e geleia real. (A) Abelhas operárias trabalhando no favo da colmeia. (B) Abelha operária depositando geleia para nutrir a larva de uma futura abelha rainha

Figura 9 – Características morfológicas das castas das abelhas da espécie *Apis mellifera*

Figura 10 – Composição nutricional e relação de aminoácidos encontrados na geleia real.

Figura 11 – Uso médico da geleia real em hospital russo

Figura 12 – Esquema Experimental

Figura 13 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 14 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 15 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 16 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 17 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 18 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 19 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 20 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de

intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 21 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 22 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 23 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 24 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 25 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial nos Períodos P1 (S1-S4), P2 (S5-S6) e P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15).

Figura 26 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro Latência ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15).

Figura 27 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro Distância Percorrida ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15).

Figura 28 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro % Tempo do Contador ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15)

Figura 29 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 30 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 31 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 32 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 33 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 34 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático

de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 35 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 36 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 37 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 38 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 39 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 40 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 41 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial nos Períodos P1 (S1-S4), P2 (S5-S6) e P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET15)

Figura 42 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro Latência ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 43 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro Distância Percorrida ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 44 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro % Tempo do Contador ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0)

Figura 45 – Efeitos da injeção icv-STZ ou solução fisiológica e da administração oral da geleia real ou água destilada avaliados no teste de Labirinto em Cruz Elevado

Figura 46 – Quantificação de neurodegeneração (células FJ-positivas) no giro denteado do hipocampo

Figura 47 – Quantificação de neurodegeneração (células FJ-positivas) na região CA1 do hipocampo

Figura 48 – Quantificação de neurodegeneração (células FJ-positivas) na região CA3 do hipocampo

Figura 49 – Número de marcações de espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) no giro denteado do hipocampo

Figura 50 – Número de marcações de espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) no hilus

Figura 51 – Número de marcações de espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) na região CA1 do hipocampo

Figura 52 – Número de marcações de espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) na região CA3 do hipocampo

Figura 53 – Quantificação de proliferação e diferenciação neuronal (células DCX-positivas) no giro denteado do hipocampo

Figura 54 – Quantificação de sobrevivência neuronal (células Brdu-positivas) no giro denteado do hipocampo

Figura 55 - Efeitos da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina e do tratamento oral com geleia real sobre a glicemia de ratos

Figura 56 - Efeitos da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina e do tratamento oral com geleia real sobre o peso corporal dos ratos

Figura 57 - Efeitos da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina e do tratamento oral com geleia real sobre a glicemia de ratos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados do Teste de Memória no Período P1 – IET15

Tabela 2 – Resultados do Teste de Memória no Período P2 – IET15

Tabela 3 – Resultados do Teste de Memória no Período P3 – IET15

Tabela 4 – Resultados do Teste de Memória no Período P1 – IET0

Tabela 5 – Resultados do Teste de Memória no Período P2 – IET0

Tabela 6 – Resultados do Teste de Memória no Período P3 – IET0

Tabela 7 – Avaliação de Neurodegeneração

Tabela 8 – Avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio

Tabela 9 – Avaliação de Proliferação de Novos Neurônios

Tabela 10 – Avaliação de Sobrevivência de Novos Neurônios

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%T-A_CONT - Porcentagem de Tempo na Área do Contador
%T-BORDA - Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina
%TEMPO – BA - Porcentagem de Tempo de Permanência nos Braços Abertos
%T-QUAD - Porcentagem de Tempo no Quadrante Crítico
10-HDA / HDEA - ácido 10-hidroxi-2-decenóico
AD - Doença de Alzheimer
AMP – Monofosfato de adenosina
APP - Precursor da proteína amiloide
ATP – Trifosfato de adenosina
A β – Peptídeo beta amilóide
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BrdU - 5-bromo-2'-deoxyuridine
CA - Corno de Amon
DAB – Diaminobenzidina
DCX – Doublecortina
DHE – Dihidroetídeo
DIST - Distância Percorrida
DMT1 - diabetes mellitus tipo 1
DMT2 - diabetes mellitus tipo 2
DTPA - ácido dietilenotriaminopentacético
EC - Córtex entorrinal
EGF - Fator de Crescimento Epidérmico
ENTRADAS – BA - Número de Entradas nos Braços Abertos
ENTRADAS – BF - Número de Entradas nos Braços Fechados
FAD - Doença de Alzheimer do tipo Familiar
FGF - Fator de Crescimento Fibroblástico
GABA – Ácido gama aminobutírico
GD - Giro Denteado
GDNF - Fator Neurotrófico Derivado de Linhagem de Célula Glial
GFAP- Proteína glial fibrilar ácida
GR - Geleia Real
icv - intracerebroventricular
IET - Intervalo de tempo entre as tentativas
IGF - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IR – Receptor de insulina
LAT - Latência para Encontrar a Plataforma
MCI – Transtorno Cognitivo Leve

MRJP - Major Royal Jelly Proteins
mRNA – RNA mensageiro
N-ACONT - Número de Entradas no Contador
NeuN - Proteína Nuclear Neuronal
NF-H - Neurofilamento H
NFT - Emaranhados neurofibrilares
NSC's - Células-tronco neurais
OMS - Organização Mundial da Saúde
PB - Tampão fosfato
PNA - Progenitores neurais amplificadores
PNQ - Células progenitoras neurais quiescentes
PS1 - presenilina 1
PS2 - presenilina 2
RMS - Via de migração rostral)
SAD – Doença de Alzheimer do tipo esporádica
SNC - Sistema Nervoso Central
STZ – estreptozotocina
Tau – Proteína Tau
TEMPO – BA - Tempo de Permanência nos Braços Abertos
TEMPO – BF - Tempo de Permanência nos Braços Fechados
TEMPO – CE - Tempo de Permanência na Área Central
TMT – Trimetilestanho
TOTG - Teste padronizado via oral de tolerância à glicose
VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VELOC - Velocidade Média do Percurso
ZSG - Zona subgranular
ZSV - Zona subventricular dos ventrículos laterais

SUMÁRIO

1 – Introdução	20
1.1 - Doença de Alzheimer	20
1.1.1 – O modelo icv-STZ	23
1.2 - Memória e Aprendizagem	26
1.2.1 - Memória Espacial	30
1.3 - Hipocampo	32
1.4 - Ansiedade e Memória	35
1.5 - Estresse oxidativo	35
1.6 – Neurogênese	36
1.7 - Geléia Real	40
2 – Objetivos	45
3 - Materiais e Métodos	45
3.1 – Animais	45
3.2 - Geleia Real	45
3.3 - Procedimento cirúrgico de injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (icv-STZ)	46
3.4 - Grupos Experimentais	46
3.5 - Testes comportamentais	46
3.5.1 - Labirinto Aquático de Morris	46
3.5.2 - Labirinto em Cruz Elevado	47
3.6 – Análises Histológicas	48
3.6.1 – Avaliação da Neurodegeneração – Análise histoquímica por Fluoro-Jade B	48
3.6.2 - Avaliação de geração de espécies reativas de oxigênio – Análise da oxidação do DHE	49
3.6.3 - Avaliação da neurogênese (Parte 1) - Análise imuno-histoquímica	50
3.6.4 - Avaliação da neurogênese (Parte 2) – Análise imuno-histoquímica	51
3.7 – Níveis de glicose no sangue periférico	52
3.8 – Peso corporal	52
3.9 – Taxa de Mortalidade	52

3.10 – Análise Estatística.....	52
4 - Delineamento experimental	53
4.1 – Avaliação do aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris.....	55
4.2 – Avaliação de ansiedade e comportamento exploratório no Labirinto em Cruz Elevado	55
4.3 - Análises Histológicas	56
5 - Resultados.....	57
5.1 – Avaliação do aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris – Intervalo de tempo entre as tentativas de 15 minutos (IET15)	57
5.2 – Avaliação do aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris – Intervalo de tempo entre as tentativas igual a “zero” (IET0)	79
5.3 – Avaliação de ansiedade e comportamento exploratório no Labirinto em Cruz Elevado	101
5.4 – Avaliação de neurodegeneração.....	102
5.5 – Avaliação de geração de espécies reativas de oxigênio	105
5.6 – Avaliação de neurogênese no giro denteado do hipocampo (Parte 1 - Proliferação e Diferenciação Celular)	111
5.7 – Avaliação de neurogênese no giro denteado do hipocampo (Parte 2 – Sobrevivência Celular)	112
5.8 – Níveis de glicose no sangue periférico	113
5.9 – Peso Corporal	114
5.10 – Taxa de Mortalidade	115
6 - Discussão	116
7 - Conclusão.....	129
8 - Referências Bibliográficas.....	130

1 – Introdução

1.1 - Doença de Alzheimer

O crescimento da expectativa de vida da população mundial tem resultado no aumento do número de indivíduos que alcançam a idade na qual as doenças neurodegenerativas tornam-se comuns (Selkoe, 2001). As doenças neurodegenerativas caracterizam-se pela degeneração de sinapses e morte de neurônios com consequente demência ou déficits nos movimentos (Haass e Kahle, 2000). A demência é uma desordem cerebral caracterizada pelo declínio global das funções mentais superiores como, memória, linguagem, personalidade, capacidade visioespacial e cognição, a qual causa prejuízos significativos na vida diária das pessoas acometidas (Fernandez *et al.*, 2008). A prevalência da demência aumenta com a idade, dobrando a cada cinco anos entre as idades de 60 e 90 anos (Corrada et al., 2008). Com base nos dados epidemiológicos, a demência é amplamente reconhecida como um significativo problema médico, social e econômico nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Breitner et al., 2009; Zilkens et al., 2009).

Atualmente estima-se haver cerca de 46,8 milhões de pessoas com demência no mundo. Este número praticamente irá dobrar a cada 20 anos, chegando a 74,7 milhões em 2030 e a 131,5 milhões em 2050, segundo dados fornecidos pelo Relatório Mundial da doença de Alzheimer (World Alzheimer Report) - 2016 divulgado pela Associação Internacional de Doença de Alzheimer (ADI - Alzheimer's Disease International) juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Prince *et al.*, 2016). A cada ano em todo mundo surgem mais de 9,9 milhões de novos casos de demência, o que significa um novo caso a cada 3,2 segundos. Os dados econômicos relacionados à demência também impressionam. O custo mundial estimado da demência foi de US\$ 818 bilhões em 2015, o que representa 1,09% do PIB global. Isto significa que se a demência global fosse um país, seria a 18ª maior economia do mundo. Os custos anuais superam os valores de mercado das maiores empresas mundiais como a Apple (US\$ 742 bilhões) e a Google (US\$ 368 bilhões) (Prince *et al.*, 2015). Entre os casos de demência, 50-80% correspondem à Doença de Alzheimer, a qual é a forma mais prevalente de demência em pessoas com mais de 65 anos (Brody, 2011).

A doença de Alzheimer (AD - Alzheimer's disease) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pelo declínio progressivo da função cognitiva, a qual leva à total dependência para as funções básicas da vida (Reitz *et al.*, 2011). Sintomas como um declínio progressivo em funções cognitivas e emocionais, mudanças comportamentais, déficits de julgamento e fluência verbal, aumentam em frequência e severidade com a evolução da doença, que tem

um grande impacto no ambiente familiar, devido à necessidade de cuidados contínuos ao paciente (Citron, 2002; Rodriguez *et al.*, 2003; Blesa, 2004). Desordens na linguagem em pessoas com AD são frequentes e incluem dificuldades de identificação, fluência, compreensão e associação das palavras, podendo levar a afasia. Desorganização no controle motor (apraxia) também pode ser percebida, além do não reconhecimento de objetos e/ou familiares (agnosia) (Helmes e Ostbye, 2002). Ainda, sintomas comportamentais e psicológicos da AD incluem agitação, comportamento motor aberrante, ansiedade, depressão e alucinações. É estimado que estes sintomas acometem cerca de 90% dos pacientes com demência, os quais afetam dramaticamente a qualidade de vida de pacientes com AD e seus cuidadores (Cerejeira *et al.*, 2012).

A AD foi descrita pela primeira vez pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1906 (Alzheimer *et al.*, 1995). Ele estudou e publicou o caso da sua paciente Auguste Deter, uma mulher saudável que, aos 51 anos foi acometida de uma doença mental incomum, desenvolvendo um quadro de perda progressiva de memória e alterações de comportamento. Após o falecimento de sua paciente, aos 55 anos, Alois Alzheimer observou que o seu tecido cerebral apresentava extensa perda de células e descreveu as alterações histológicas características da doença: placas senis e emaranhados neurofibrilares (Alzheimer *et al.*, 1995).

Figura 1 – A identificação da doença de Alzheimer. (A) Alois Alzheimer. (B) O primeiro caso: Auguste Deter. Fonte: (Feldman, 2007)

A AD é uma enfermidade complexa cujos mecanismos patogênicos ainda não foram suficientemente elucidados (Suh e Checler, 2002). As manifestações patológicas da AD incluem placas amiloides extracelulares, contendo agregados de proteína beta amiloide ($A\beta$) e emaranhados neurofibrilares intracelulares (Intracellular Neurofibrillary Tangles - NFT), composto por proteína tau hiperfosforilada, acompanhados por ativação da microglia, astroglia reativa, neuritos distróficos, morte de neurônios e perda de sinapses, principalmente no córtex entorrinal, hipocampo, córtex cerebral e amígdala (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Estas

alterações neuropatológicas clássicas contribuem para o processo neurodegenerativo na AD afetando a atividade sináptica e plasticidade com consequências prejudiciais para a função neuronal normal. Evidentemente, disfunção e perda sináptica estão entre as mais bem conhecidas alterações correlacionadas com déficit de memória e alterações cognitivas (Galeano *et al.*, 2014).

Figura 2 – Principais manifestações patológicas da doença de Alzheimer – marcações histológicas – placas amilóides extracelulares (setas verdes) e emaranhados neurofibrilares intracelulares (setas azuis). Fonte: (Nelson *et al.*, 2012)

A AD pode ser categorizada como esporádica (SAD – Sporadic Alzheimer's Disease) ou familiar (FAD - Familiar Alzheimer's Disease). A AD do tipo familiar (FAD) representa apenas 5% dos casos, caracterizando-se pela instalação mais precoce do quadro clínico, que surge entre 40 e 60 anos de idade, e com progressão acelerada da doença (Harman, 2006). Esta forma da AD, seria causada por mutações nos genes das presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2) e no gene precursor da proteína amiloide (APP), localizados nos cromossomos 14, 1 e 21 respectivamente (Suh e Checler, 2002; Mattson, 2004; Parihar e Hemnani, 2004). A grande maioria dos casos da AD, em torno de 95% do total, é do tipo esporádico (SAD), o qual tem uma evolução mais lenta e os sintomas surgem por volta dos 65 anos de idade (Suh e Checler, 2002; Harman, 2006). A AD do tipo SAD tem como principal fator de risco o envelhecimento (Suh e Checler, 2002). Os sintomas da SAD resultam de múltiplos fatores etiológicos, incluindo fatores ambientais, genéticos e metabólicos, dentre os quais, a redução do metabolismo de glicose e utilização de energia são observados nos estágios iniciais da doença (Chen *et al.*, 2012). Atualmente não há nenhum tratamento definitivo para AD e os tratamentos existentes apenas retardam a progressão da doença e controlam alguns sintomas (Robert *et al.*, 2009).

Com a identificação de parte dos genes causadores da AD, tais genes têm sido utilizados no desenvolvimento de modelos animais da AD, os quais têm contribuído consideravelmente no entendimento da fisiopatologia da doença. Esses modelos consistem no desenvolvimento de ratos ou camundongos transgênicos portadores dos genes

causadores da AD em humanos. Desta forma, modelos transgênicos de animais portadores de mutações, como o APP ou PS1, desenvolvem a patologia idade-dependente de deposição de placas β -amilóide (A β), similar ao que se encontra em pacientes diagnosticados com DA, como prejuízo precoce de memória visuoespacial (O'leary e Brown, 2009; Philipson *et al.*, 2010; Stover e Brown, 2012). Assim, modelos genéticos com coexpressão de mutações no APP e PS1 – como os modelos APP/PS1KI (Casas *et al.*, 2004), Tg2576 e 5XFAD (Oakley *et al.*, 2006) – apresentam perda neuronal, além do acúmulo típico de β -amilóide. De forma similar, camundongos transgênicos que expressam mutações APP/tau foram utilizados no desenvolvimento do modelo transgênico triplo 3xTgAD que abriga o gene mutante da PS1, APP e Tau e, que resultou em um modelo que produz o acúmulo de emaranhados neurofibrilares, além da deposição de placas e declínio cognitivo dependente da idade em uma variedade de paradigmas comportamentais (Webster *et al.*, 2014).

Atualmente a grande maioria das pesquisas são realizadas com a utilização de modelos transgênicos, os quais representam AD do tipo Familiar, a qual é a forma menos prevalente da doença. Neste sentido, existe hoje a necessidade da realização de pesquisas com a utilização de modelos não transgênicos, os quais representem a AD do tipo Esporádica, a qual acomete a grande maioria dos pacientes.

1.1.1 – O modelo icv-STZ

Reflexões sobre algumas das descobertas sobre a fisiopatologia da AD, incluindo a redução da utilização da glicose cerebral, disfunção mitocondrial, redução da produção de ATP e desregulação energética levaram a consideração da hipótese de que essas anormalidades eram mediadas pela dessensibilização dos receptores de insulina (IR – *Insulin Receptor*) neuronais (Duelli *et al.*, 1994; De La Monte *et al.*, 2006). Estudos demonstram que alterações na cascata de sinalização da insulina estão relacionadas à disfunção neuronal, declínio cognitivo e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Candeias *et al.*, 2012). Trabalhos apresentam dados que a insulina cerebral e respectivos receptores estão funcionalmente ligados ao desempenho cognitivo, particularmente à memória espacial devido à regulação do mRNA da insulina no hipocampo e pelo aumento dos IR nas membranas sinápticas do hipocampo (Zhao *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004). Dados também indicam que a deficiência de insulina cérebro e o estado cerebral resistência à insulina estão relacionados com o aparecimento SAD (De La Monte e Wands, 2008). Estudos post-mortem de cérebros humanos relacionam diversas características moleculares e patológicas da AD ao nível reduzido de expressão dos genes de insulina e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

(IGF), assim como seus correspondentes receptores no cérebro. Foram demonstradas que as deficiências cerebrais na utilização de glicose e no metabolismo energético, assim como disfunções nas vias de sinalização de insulina e IGF representam anormalidades precoces que precedem ou acompanham os estágios iniciais do prejuízo cognitivo, e pioram com o avanço da doença. Todas estas informações dão suporte à hipótese de que a sinalização deficiente de insulina tem um papel importante na patogênese da DA (De La Monte e Wands, 2008). Evidências mostram que a doença de Alzheimer e a diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) apresentam várias semelhanças bioquímicas, incluindo defeitos na via de sinalização da insulina (De La Monte *et al.*, 2006; De La Monte e Wands, 2008; De La Monte, 2014). Uma série de estudos longitudinais tem demonstrado que os distúrbios no metabolismo da glicose e insulina estão associados ao elevado risco do desenvolvimento da AD e outras demências (Ott *et al.*, 1996; Rönnekaa *et al.*, 2008; Butterfield *et al.*, 2014). Evidências também apontam que pacientes com DMT2, principalmente idosos, apresentam comprometimento cognitivo (Biessels *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado em uma pesquisa, a qual dedicou 2 anos de observação, que pacientes diagnosticados com Transtorno Cognitivo Leve (MCI – Mild Cognitive Impairment) que possuem os níveis de glicemia dentro dos níveis adequados apresentam menor disfunção cognitiva, menor redução do volume cerebral e menor índice de conversão para AD com relação aos indivíduos diagnosticados com MCI e que possuem níveis de glicemia alterados (Morris *et al.*, 2014).

Em acordo com a hipótese da SAD ser reconhecida como um estado cerebral resistente à insulina (Frolich *et al.*, 1998; Lannert e Hoyer, 1998) associada à estudos posteriores, os quais indicaram a presença de um estado de resistência cerebral à insulina em pacientes (post-mortem) com AD (De La Monte e Wands, 2008) e a progressão desse sintoma com a severidade da demência (Correia *et al.*, 2011; De La Monte, 2014), foi proposto o modelo icv-STZ em roedores, o qual apresenta diversos aspectos das anormalidades da SAD, incluindo prejuízo cognitivo e de memória (Mayer *et al.*, 1990). Este modelo pode ser gerado pela injeção intracerebroventricular (icv) de estreptozotocina (STZ) (Grunblatt *et al.*, 2007), um composto diabetogênico que é comumente utilizado para induzir diabetes em animais quando administrado perifericamente devido sua capacidade de causar lesão nas células β pancreáticas e induzir resistência à insulina (Szkudelski, 2001). A estreptozotocina (STZ) é uma droga seletivamente tóxica para as células secretoras de insulina e que consequentemente prejudica o sistema insulina-receptor de insulina (Blokland e Jolles, 1993). Quando aplicada por via intraperitonal em altas doses (45-75 mg/kg), STZ é tóxica para as células produtoras de insulina, o que induz experimentalmente a Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1). Em doses baixas (20-60 mg / kg), a administração intraperitonal de STZ em ratos

neonatais causa danos nos receptores de insulina (IR), alterando a sinalização destes receptores, provocando um estado de resistência à insulina, induzindo a Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) (Blondel e Portha, 1989).

Considerando a presença de insulina e receptores de insulina no cérebro, um modelo experimental para induzir um estado cerebral de resistência à insulina foi desenvolvido utilizando estreptozotocina (STZ) administrada por via intracerebroventricular (icv) com doses de até 100 vezes inferior do que aquelas utilizadas periféricamente (Duelli *et al.*, 1994; Lannert e Hoyer, 1998). Conforme Mayer e colaboradores (1990), o modelo SAD em roedores é produzido com uma única ou múltiplas injeções icv-STZ (até 3 dentro de um mês) administradas uni ou bilateralmente no ventrículo lateral do cérebro de ratos adultos, principalmente em doses 1-3 mg/kg de peso corporal (Mayer *et al.*, 1990).

Seigfried Hoyer (1998) foi um dos primeiros a sugerir que os níveis reduzidos de insulina no cérebro podem precipitar uma cascata resultando em distúrbios nos mecanismos de glicose celular, acetilcolina, colesterol e nos níveis de ATP, prejuízos na função da membrana, acúmulo de derivados amiloidogênicos, hiperfosforilação da proteína tau, e que, um distúrbio na via de transdução do sinal de insulina pode ser um evento fisiopatológico inicial central da SAD (Hoyer, 2004; Hoyer e Riederer, 2007; Li e Holscher, 2007). A administração cerebral de STZ induz alterações nos receptores de insulina do cérebro (IR) e na sua sinalização, ocorrendo conseqüentemente o estado cerebral resistente à insulina, com diminuição do metabolismo da glicose cerebral (Chen *et al.*, 2013), acarretando assim alterações comportamentais, neuroquímicas, morfológicas e histológicas semelhantes ao envelhecimento cerebral (Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006). Alterações gênicas relacionadas à sinalização dos receptores de insulina e metabolismo da glicose também foram identificadas no cérebro de ratos icv-STZ, em especial no hipocampo e no córtex (Chen *et al.*, 2012). De um modo geral, as principais alterações neuroquímicas e estruturais têm sido observadas nas primeiras duas semanas após a administração de icv-STZ, as quais persistem por 12 semanas, acompanhadas por déficits progressivos e de longo prazo no aprendizado e memória, desempenhando um papel significativo na mimetização da patogênese da SAD (Lannert e Hoyer, 1998; Grunblatt *et al.*, 2007). No cérebro dos animais submetidos à injeção icv-STZ ocorre a diminuição dos níveis de glicose, metabolismo de energia, e conseqüentemente, a disfunção mitocondrial, as quais foram relatadas a partir de 3 semanas após a administração de icv-STZ, sobretudo em regiões do córtex e hipocampo (Pathan *et al.*, 2006). Foi demonstrado que ratos submetidos à administração icv-STZ apresentam diversas características da AD, incluindo comprometimento cognitivo e distúrbios na homeostase da acetilcolina (De La Monte e Wands, 2008). Outras referências também indicam que a

resistência à insulina no cérebro em ratos submetidos à icv-STZ diminui o metabolismo da glicose cerebral, causa déficits colinérgicos, estresse oxidativo, gliose reativa, fosforilação da proteína tau e acúmulo do peptídeo beta amiloide (A β), além de déficit de memória e aprendizagem (De La Monte, 2014).

1.2 - Memória e Aprendizagem

A aprendizagem e a memória são propriedades fundamentais do sistema nervoso central (SNC), sendo que ambas estão intimamente relacionadas. A aprendizagem consiste no processo pelo qual adquirimos conhecimento sobre o mundo, enquanto a memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, retido e, posteriormente, recuperado (Izquierdo, 1989). Conceitualmente a memória pode ser definida como o processo de armazenamento e evocação de informações adquiridas através de experiências. O aprendizado pode ser quantificado experimentalmente como a probabilidade com que um organismo responderá diferentemente ao mesmo estímulo após sua repetição. Esta alteração de comportamento está baseada na memória daquilo que foi aprendido pelo organismo após sua exposição a uma novidade ou a um novo acontecimento (Agranoff, 1998). Do ponto de vista evolutivo, a capacidade de adquirir novas informações é uma das mais importantes funções do sistema nervoso central, e a expressão de memórias previamente adquiridas é crucial para a sobrevivência e evolução das espécies (Morgado, 1999).

A formação de memórias é dependente da capacidade do sistema nervoso de modificar-se frente a experiências. Acredita-se que o arquivamento de informações no sistema nervoso seja decorrente de alterações transitórias na atividade eletrofisiológica de populações de neurônios distribuídos no sistema nervoso, para o armazenamento de informações por curtos períodos de tempo; processos de facilitação de transmissão sináptica, para o arquivamento de informações por períodos intermediários de tempo e de modificações estruturais permanentes na conectividade neuronal, para o arquivamento de informações por períodos prolongados de tempo (Helene e Xavier, 2007).

Evidências que sugerem que não há um único sistema de memória, mas sim um quadro mais complexo, no qual a memória pode ser vista como diversos sistemas de armazenamento de informações, que possuem a capacidade de codificar, armazenar e evocar informações (Baddeley e Eysenck, 2011; Izquierdo, 2011). O processamento da memória divide-se nas fases de aquisição, consolidação, armazenamento e evocação. O primeiro dos processos mnemônicos é a aquisição, que consiste na entrada de um evento qualquer nos sistemas neurais ligados à memória (Fig.3). Por “evento” entendemos qualquer

coisa memorizável: um objeto, um som, um acontecimento, um pensamento, uma emoção, uma sequência de movimentos. Durante a aquisição ocorre uma seleção: como os eventos são geralmente múltiplos e complexos, os sistemas de memória só permitem a aquisição de alguns aspectos mais relevantes para a cognição, mais marcantes para a emoção, mais focalizados pela atenção, mais fortes sensorialmente, ou simplesmente priorizados por critérios desconhecidos (Lent, 2010). No processo de retenção da memória os aspectos selecionados de um evento são armazenados por algum tempo, desde alguns segundos até muitos anos, e ficam de algum modo disponíveis para serem lembrados. Com o passar do tempo, alguns destes aspectos, ou mesmo todos eles podem desaparecer da memória: é o esquecimento (Fig.3). A consolidação refere-se aos processos que alteram a informação recém-retida e ainda lábil, de modo a torna-la mais estável para a retenção a longo prazo (Lent, 2010). Durante essa fase, a expressão de genes e a síntese de novas proteínas originam alterações estruturais que mantêm a estabilidade da memória de longo prazo. O processo de armazenamento é o processo através do qual o traço de memória, mais consistente, é retido de maneira mais permanente ao longo do tempo. Finalmente, quando a memória já está de algum modo armazenada, ela pode ser evocada, permitindo o acesso as lembranças e o uso das informações adquiridas (Kandel *et al.*, 2012).

Figura 3 – Esquema do processamento da memória. Fonte (Lent, 2010).

A memória pode ser classificada quanto ao tempo de retenção em (1) memória ultrarrápida ou imediata (memória sensorial), cuja retenção não dura mais que alguns segundos; (2) memória de curta duração, que dura minutos ou horas, e serve para proporcionar a continuidade do nosso sentido do presente; e (3) memória de longa duração, que estabelece engramas duradouros (dias, semanas e até mesmo anos). A memória também pode ser classificada quanto à sua natureza em (1) memória explícita ou declarativa;

(2) memória implícita ou não declarativa; e (3) memória operacional ou memória de trabalho (Lent, 2010). A seguir é apresentada uma breve descrição de cada tipo de memória:

- Memória ultrarrápida – É também chamada de memória sensorial. A característica desta forma de memória ultrarrápida é ser pré-consciente, isto é, não alcançar a consciência (Lent, 2010).
- Memória de curta duração (MCD) - Refere-se à retenção temporária de pequenas quantidades de material sobre breves períodos de tempo. Segundo Izquierdo (2011), estende-se desde os primeiros segundos ou minutos que sucedem ao aprendizado até 3 ou 6 horas. O termo memória de curta duração também é utilizado para referir-se ao desempenho em tarefas que envolvem a retenção simples de pequenas quantidades de informação e que são testadas imediatamente ou após um pequeno intervalo de tempo (Baddeley e Eysenck, 2011; Izquierdo, 2011). Por fim, vale ressaltar o papel da memória de curta duração, que serve para dar uma sequência a episódios, e proporcionar a continuidade de nosso sentido de presente (Lent, 2010). Assim, ela cumpre com seu papel de ‘alojamento temporário’, enquanto o arquivo definitivo está sendo formado. A memória de curta duração (MCD) se diferencia da memória de longa duração (MLD), que será descrita posteriormente, não pelo conteúdo cognitivo, mas por apresentarem dois processos paralelos e independentes (Izquierdo, 2011).
- Memória Operacional (MO) – Por um tempo foi confundida com memória de curto prazo, mas na década de 80 começou a ser vista como sendo mais complexa que um armazenamento de curto prazo (Eysenck, 2007). A principal diferença está no papel da MO, que não é o de formar engramas. Além disso, esta ocupa outras estruturas neurais, como o córtex pré-frontal (Izquierdo, 2011). A memória operacional é composta por multicomponentes – o executivo central, a alça fonológica, o esboço visuoespacial e o *episodic buffer*. Esses componentes, basicamente, consistem em arquivar informações verbais e visuais temporariamente através de um controle de atenção, e por fim, integrar essas informações com outras da memória de longa duração (Eysenck, 2007). A MO é um espaço mental de trabalho que é necessário nas atividades cognitivas complexas, como o processo de leitura, por exemplo, porque ela conserva na consciência as sequências de palavras, que formam uma frase por tempo suficiente até que haja significação (Baddeley e A. Eysenck, 2011; Izquierdo, 2011). Entre outras palavras, a memória operacional, através do *episodic buffer*, verifica na

memória de longa duração a existência de significado para aquele conjunto de palavras, naquele contexto-frase, sendo que este processo ocorre em segundos (Izquierdo, 2011). Se as informações processadas na leitura forem novas, a memória operacional irá administrar a informação, decidindo se é relevante ou não para o indivíduo e se irá descartar ou formar uma nova memória.

- Memória de longa duração (MLD) – É um sistema que serve de base à capacidade de armazenar informação por longos períodos de tempo. A MLD subdivide-se em memória declarativa/explicita e não declarativa/implícita, de acordo com o conteúdo armazenado (Baddeley e Eysenck, 2011; Izquierdo, 2011). A memória implícita opera inconscientemente e automaticamente, como na memória dos hábitos e habilidades perceptivas e motoras, enquanto a memória explícita opera conscientemente, como na memória para pessoas, lugares e objetos. O armazenamento a longo prazo da memória explícita começa no hipocampo e no lobo temporal medial do neocórtex, enquanto que o armazenamento a longo prazo da memória implícita requer uma família de estruturas: o neocórtex para “priming”, o corpo estriado para habilidades e hábitos, a amígdala para o medo aprendido, o cerebelo para as habilidades motoras aprendidas e certas vias reflexas para a aprendizagem não-associativa, como habituação e sensibilização (Kandel et al., 2013).
- A memória implícita/não declarativa - Consiste na retenção de conteúdos não verbalizáveis como as habilidades motoras. Envolve treinamento, repetição e a aquisição, sendo que a aquisição dessas habilidades é gradual. A evocação desses conteúdos de memória de longa duração se dá por meio do desempenho, em lugar da lembrança consciente (Baddeley e Eysenck, 2011; Izquierdo, 2011).
- A memória explícita/declarativa está aberta à evocação intencional, seja com base na recordação de eventos pessoais (memória episódica), ou de fatos (memória semântica).
- Memória semântica – Corresponde ao armazenamento de informações relativas aos conhecimentos gerais, incluindo conceitos, significados de palavras e de fatos socialmente compartilhados. Todo o conteúdo arquivado é passível de relato verbal, mas não tem ancoragem no tempo e nem no espaço (Baddeley e Eysenck, 2011; Izquierdo, 2011).

- Memória episódica – É onde os eventos que dizem respeito à história pessoal e eventos específicos estão arquivados e, ao contrário da memória semântica, são ancorados no tempo e no espaço (Baddeley e Eysenck, 2011; Izquierdo, 2011). Esses eventos também são passíveis de relato verbal, quer dizer, podem ser evocados de maneira consciente. Logo, compreende-se que as informações contidas nesses sistemas de memória explícita podem ser relatadas verbalmente, quer dizer, o indivíduo possui acesso consciente ao conteúdo e pode, assim, declará-lo (Baddeley e Eysenck, 2011; Izquierdo, 2011).

Na imensa maioria dos casos, o envelhecimento não se acompanha de alterações cognitivas além de uma leve diminuição da capacidade de evocação, conhecida como “amnésia benigna do idoso”. Mas, numa minoria, que chega a atingir 30-40% do total da população de 85 ou mais anos, manifestam-se doenças degenerativas do sistema nervoso, chamadas de demências. Estas envolvem perda neuronal e perda de sinapses, seu início é insidioso, e se traduzem por uma perda da cognição, principalmente da memória, até níveis incapacitantes. A mais comum das demências é a doença de Alzheimer (Prado, 2007).

1.2.1 - Memória Espacial

A memória espacial é crucial para a sobrevivência, pois está relacionada com a habilidade de deslocamento flexível no ambiente onde se vive e envolve os processos de codificação, armazenamento e recuperação de informações sobre localizações espaciais (O’ Keefe e Nadel, 1978; Xavier, 1993). O’ Keefe e Nadel (1978) distinguiram diversas estratégias utilizadas pelos animais para navegar no ambiente e sugeriram que mais de uma estratégia pode ser utilizada simultaneamente para resolver tarefas espaciais. Estes autores propuseram a teoria do mapa cognitivo, na qual é apresentada a ideia de que através do conhecimento prévio do ambiente os animais conseguem configurar relações entre o posicionamento de objetos, tal qual um mapa cartográfico propriamente dito. Em qualquer ambiente existe normalmente um grande número de estímulos e, assim, a identificação de um determinado local não depende de qualquer pista (ou objeto) ou grupo de pistas em particular. O animal parece detectar as múltiplas relações entre os objetos e estímulos do ambiente, independentemente de sua própria localização no meio, como se dispusesse de um mapa aloentríco daquele ambiente. Os mapas cognitivos são formados durante a exploração do ambiente, e podem ser utilizados pelos animais para se localizarem no

ambiente, localizarem itens ou eventos, incluindo recompensas e punições, ou ainda para se locomoverem de um local para outro por qualquer rota disponível. Através da exploração prévia do ambiente, o animal pode, então, guiar-se utilizando essas relações ambientais conhecidas, valendo-se de múltiplas triangulações entre estímulos ambientais e ele próprio, possibilitando a realização de cálculos de posicionamento cada vez que o animal se desloca. Segundo a teoria do mapa cognitivo, a formação hipocampal participa da codificação do ambiente em mapas cognitivos, e contribui também para o armazenamento dessas informações (O' Keefe e Nadel, 1978).

Ainda, segundo esses autores, há o sistema de táxon de navegação, no qual são utilizadas as estratégias de guiamento e orientação espacial, as quais independem da formação hipocampal. A estratégia de orientação egocêntrica tem como base a sinalização proprioceptiva e rotações do corpo, em relação a um estímulo externo marcante. Os animais aprendem uma sequência de movimentos corporais através de informações egocêntricas e aprendem uma sequência de comportamentos para atingir o local ou pista alvo. A estratégia de guiamento baseia-se na movimentação (aproximação ou distanciamento) em relação a um objeto ou pista específica, sem a necessidade de estabelecer triangulações entre objetos e eventos do ambiente. Segundo O' Keefe e Nadel (1978), a navegação baseada em estratégias de orientação/guiamento é pouco flexível, uma vez que essa é dependente de um estímulo preponderante. Já a navegação baseada em mapas cognitivos (estratégia de lugar) proporciona uma maior flexibilidade e adaptação a mudanças ambientais, pois mesmo após a remoção de diversos estímulos de um ambiente, o animal ainda será capaz de orientar-se se alguns objetos ou pistas inicialmente presentes ainda estiverem disponíveis.

Diversos estudos envolvendo lesões ou danos ao hipocampo indicam que a formação hipocampal é necessária para a aprendizagem das relações ambientais que permitem a configuração do "mapa cognitivo" para elaboração flexível das estratégias de navegação espacial. Por outro lado, quando o animal desloca-se seguindo um estímulo visual que indica a posição da localidade almejada ou quando o repertório motor para o alcance daquela localização é conhecido, a formação hipocampal não prepondera à eficiência da navegação (Xavier *et al.*, 1999).

Para a investigação da memória espacial em animais, diferentes tipos de labirintos vêm sendo utilizados. O labirinto aquático introduzido por Morris (1984) é intensamente utilizado em pesquisas sobre as capacidades de orientação espacial em roedores, sobre a retenção dessas informações no sistema nervoso por períodos variáveis de tempo, bem como na investigação dos mecanismos neurais subjacentes a essas capacidades. A tarefa consiste em o rato encontrar uma plataforma submersa, não visível, em determinada

localização dentro de uma piscina, a fim de escapar da água. Trabalhos demonstram que ratos normais são capazes de utilizar estratégias de lugar, de orientação e de guiamento simultaneamente para solucionar a tarefa de navegação espacial no labirinto aquático de Morris (Whishaw e Mittleman, 1986). Ratos treinados a buscar a plataforma partindo de diferentes pontos da borda da piscina devem aprender sobre as posições relativas dos estímulos distais e da plataforma submersa em relação a esses estímulos de modo a desempenhar a tarefa; isto demanda o uso da estratégia de lugar (que envolve orientação aloentrica). Diferentemente, ratos treinados partindo de um único ponto da borda da piscina podem utilizar estratégias de guiamento e/ou de orientação. Além disso, se a localização da plataforma é mantida constante ao longo das sessões de treino, é possível avaliar a memória de referência espacial (um tipo de memória de longa duração; o animal deve diariamente procurar a plataforma no mesmo local, que assim independe do contexto temporal). Por outro lado, se a plataforma é apresentada numa localização diferente a cada dia, com pelo menos duas tentativas por dia, é possível avaliar a memória operacional espacial.

1.3 - Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura do sistema nervoso central, localizada no lobo temporal medial de cada hemisfério encefálico, cuja integridade funcional é fundamental para os processos de aprendizagem e memória (Izquierdo e Medina, 1997). No hipocampo a informação recentemente adquirida é processada por um período de semanas ou meses, a qual é posteriormente transferida para áreas específicas do córtex cerebral para um armazenamento mais prolongado (Baddeley, 1997). Esta estrutura tem conexões com a amígdala e septo medial, córtex entorrinal, córtex pré-frontal e córtex parietal associativo (Hyman *et al.*, 1990), sendo que todas essas áreas são essenciais para a formação das memórias declarativas (Van Hoesen e Hyman, 1990).

O hipocampo é subdividido com base na morfologia celular e projeções de fibras em regiões CA (*Cornu Ammonis*) denominadas CA1, CA2, CA3, e CA4, e em região superior e inferior ou região septal (dorsal) e região temporal (ventral) (Blackstad, 1956; Brown e Zador, 1990) (Fig.4). As regiões CA1 e CA3 formam o hipocampo propriamente dito, e como CA2 é pequeno e indistinto em algumas espécies ele é frequentemente incluído em CA1. O giro denteado (GD), o subiculum, o córtex entorrinal (EC) e CA4 são incluídos no termo “formação hipocampal,” e a área localizada entre o GD e a região CA3 é chamada de polimórfica, região hilar ou simplesmente hilus (Brown and Zador, 1990 (Van Groen *et al.*, 2003).

Figura 4 – Localização do hipocampo de ratos

O hipocampo apresenta fundamentalmente três camadas, a camada polimórfica (*stratum oriens*) (camada mais externa), camada piramidal (*stratum pyramidale*) (camada média), e camada molecular (*stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*) (camada mais profunda). O GD consiste em camada polimórfica (hilus) (camada mais profunda), camada granular (*stratum granulosum*) (camada média) e a camada molecular (*stratum moleculare*) (camada mais externa) que é contínua com o hipocampo (Brown e Zador, 1990). Os principais neurônios do hipocampo são os neurônios piramidais de CA1, CA2 e CA3 e os principais neurônios do GD são as células granulares.

As conexões sinápticas no hipocampo são geralmente axodendríticas e axosomáticas e os principais neurotransmissores são, GABA, norepinefrina, glutamato e acetilcolina (Brown e Zador, 1990). As aferências mais densas do hipocampo provêm do córtex entorrinal e a propagação da informação entorrinal aferente no interior do hipocampo se dá através de uma sequência de sinapses excitatórias que de uma forma simplificada é referida como um circuito trissináptico (Fig.5). A primeira sinapse desse circuito ocorre na camada molecular do GD, entre as fibras do córtex entorrinal, que constituem a via perfurante, e os dendritos das células granulares do giro denteado. A segunda sinapse ocorre entre os axônios das células granulares do giro denteado (fibras musgosas) e os neurônios piramidais de CA3, de onde partem os axônios (vias colaterais de Schaffer) para formar a terceira sinapse com as células piramidais de CA1. A região CA1 do hipocampo emite fibras para uma região vizinha

denominada subículo, que por sua vez, faz sinapses com células do córtex entorrinal. O córtex entorrinal possui importantes conexões aferentes e eferentes com o córtex pré-frontal, com os córtices associativos parietal, occipital e cingulado anterior e com o restante do córtex do lobo temporal (Van Hoesen e Hyman, 1990; Izquierdo *et al.*, 1998; Izquierdo *et al.*, 2000). Nesse sentido, as operações funcionais intrínsecas que ocorrem tanto no giro denteado, hipocampo e no córtex entorrinal, têm um papel importante no processamento subsequente da informação e consolidação da memória (Turner *et al.*, 1998).

Figura 5 - Conectividade, circuitos e organização regional e laminar da formação hipocampal. EC: Córtex entorrinal, DG: Giro denteado, CA, Corno de Amon, SUB: Subículo. Camadas do Giro denteado: molecular (Mol), granular (Gr) e polimórfica (Pol). Camadas do Hipocampo: stratum oriens (Or), stratum pyramidale (Py) e stratum radiatum (Rad). Aferências da camada II do EC excitam neurônios granulares novos e “adultos” e células em cesto da camada granular. Neurônios piramidais de CA3 também recebem terminais axonais da camada II do EC. Células musgosas e interneurônios da camada polimórfica realizam alça de retroalimentação com neurônios granulares. As fibras musgosas dos neurônios granulares fazem a segunda sinapse do circuito básico com os dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA3 que enviam seu axônios (colaterais de Schaffer) para CA1 onde fazem sinapse excitatória com os dendritos apicais dos neurônios piramidais. Os neurônios piramidais de CA1 também recebem sinapses excitatórias, nos dendritos apicais e basais, de neurônios da camada III do EC. Os neurônios piramidais de CA1 são a principal via eferente para o SUB e a camada V do EC. Adaptado de (Aimone *et al.*, 2014)

1.4 - Ansiedade e Memória

A ansiedade é uma emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco, quando o perigo ou estímulo aversivo é incerto (Blanchard e Blanchard, 1988). A ansiedade tem suas raízes nas reações de medo dos animais, e ambos os fenômenos podem gerar respostas psicofisiológicas semelhantes, o que leva a supor a existência de mecanismos neurais comuns para ambos os estados emocionais (Graeff *et al.*, 1993). A principal distinção entre medo e ansiedade reside nas características dos estímulos ou das situações pelos quais estes estados emocionais são desencadeados. Enquanto o medo seria desencadeado por situações específicas, claras e evidentes de perigo; a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e obscuro (Graeff *et al.*, 1993).

Alguns estudos mostram que a ansiedade seria um passo necessário para a formação da memória (Mathews, 1990; Beuzen e Belzung, 1995; Silva e Frussa-Filho, 2000). Estes trabalhos indicam que até certo nível, a ansiedade favorece o desempenho de tarefas motoras e cognitivas, sendo assim considerada fisiológica, mas passa a ser patológica quando passa a interferir no comportamento normal do indivíduo (Graeff *et al.*, 1993), ou seja, a relação entre a ansiedade e o desempenho da memória segue a curva de Gauss, com melhor desempenho quando os níveis de ansiedade estão em um nível ideal (Salehi *et al.*, 2010).

1.5 - Estresse oxidativo

Conceitualmente, o estresse oxidativo refere-se ao estado em que a produção de agentes oxidantes ultrapassa a capacidade dos mecanismos antioxidantes. De maneira geral, o encéfalo e os tecidos nervosos estão mais propensos aos danos oxidativos devido a fatores como o alto fluxo de cálcio pelos neurônios, a presença de neurotransmissores excitatórios, principalmente o glutamato, além da alta taxa de consumo de oxigênio molecular (O₂) pelos tecidos nervosos (Markesbery, 1999; Garcia, 2009). Evidências crescentes demonstram que o estresse oxidativo é um importante fator que colabora no início e na progressão da AD e que tratamentos antioxidantes podem ser benéficos para doenças neurodegenerativas (Markesbery, 1997; Perry *et al.*, 2002; Zhao e Zhao, 2013).

A estrutura química da STZ também sugere que este composto possa produzir radicais livres intracelulares, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (Szkudelski, 2001) que podem desencadear uma cascata de alterações bioquímicas e estruturais caracterizadas por diminuição do aporte de glicose ao neurônio, disfunção mitocondrial, diminuição de ATP, ativação de astrócitos e microglia. Estes efeitos em conjunto podem levar a uma cascata de

morte com formação de radicais livres, liberação de mediadores inflamatórios, hiperfosforilação da proteína Tau e agregados de peptídeo A β resultando em estresse oxidativo, neuroinflamação e morte celular (Deshmukh *et al.*, 2009; Mehan *et al.*, 2011).

Uma tendência progressiva para o estresse oxidativo foi encontrada no córtex e região hipocampal, com início em uma semana após a administração de icv-STZ (Pathan *et al.*, 2006). As alterações significativas nos marcadores de dano oxidativo e diminuição do nível de ATP foram observadas no hipocampo e córtex cerebral, durante período de 2-3 semanas após a aplicação icv-STZ (Ishrat, Hoda, *et al.*, 2009; Ishrat, Parveen, *et al.*, 2009). Evidências de estresse oxidativo também foram encontradas no cérebro de ratos considerados idosos, com 1 ano de vida, após 3 semanas de uma única dose de icv-STZ (1,5 mg/kg). O aumento da geração de radicais livres e posterior estresse oxidativo são bem relatados quanto à geração de prejuízos de aprendizado e memória, levando à disfunção cognitiva (Ishrat, Hoda, *et al.*, 2009; Ishrat, Parveen, *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2009). Além dos efeitos de estresse oxidativo, a administração de icv-STZ também tem sido associada com certas alterações morfológicas cerebrais, seguido por extensa perda de células, neurodegeneração e astrogliose encontradas uma semana após o tratamento, independentemente da idade dos animais (Sonkusare *et al.*, 2005).

1.6 – Neurogênese

A descoberta de que o cérebro de mamíferos adultos produz novos neurônios a partir de células tronco foi um avanço na neurociência, e nos últimos anos, uma ampla gama de investigações tem sido direcionada para a compreensão dos mecanismos fisiológicos e a relevância funcional da neurogênese adulta (Abrous *et al.*, 2005; Bruel-Jungerman *et al.*, 2007). As células tronco-neurais (NSC's - Neural Stem Cells), também classificadas de maneira geral como células precursoras, são um tipo especial de células somáticas que possuem capacidade de auto renovação além de potencial para se diferenciarem em mais de uma linhagem celular, e a capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (Sohur *et al.*, 2006). A neurogênese é um processo complexo que se inicia com a proliferação de células precursoras, as quais são submetidas a vários fatores de regulação que influenciam a continuidade do processo neurogênico, o qual segue com diferenciação celular, determinação do fenótipo neuronal, maturação morfológica e fisiológica para o desenvolvimento das características de funcionamento neuronal, e finaliza-se com a existência de um novo neurônio funcional e integrado a redes já existentes (Hattori *et al.*, 2007a; Ming e Song, 2011).

Um nicho neurogênico é caracterizado pela presença de células precursoras em um ambiente propício para a geração de novos neurônios. No cérebro de mamíferos adultos duas regiões são reconhecidas como nichos neurogênicos, nas quais novos neurônios são gerados continuamente: a zona subgranular (ZSG) do giro denteado do hipocampo (GD) e na zona subventricular dos ventrículos laterais (ZSV) (Fig.6). As células precursoras localizadas na porção anterior da zona subventricular na parede dos ventrículos laterais (ZSV) migram pela via de migração rostral (RMS - Rostral Migratory Stream) até o bulbo olfatório onde se diferenciam em interneurônios inibitórios granulares ou periglomerulares (Lois e Alvarez-Buylla, 1993; Alvarez-Buylla *et al.*, 2000). Na região hipocampal, as células progenitoras localizadas na zona subgranular do giro denteado (ZSG) iniciam sua diferenciação e, ao longo da primeira semana, migram para a camada granular onde passam pelo processo de maturação dando origem a células granulares com sinapses funcionais (Gage, 2002; Kempermann *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2010). Os experimentos da presente dissertação estão concentrados na neurogênese hipocampal, que ocorre na zona subgranular do giro denteado, e portanto, este será o foco da descrição neste tópico.

Figura 6 – Nichos neurogênicos do cérebro de ratos: zona sub-ventricular dos ventriculos laterais – ZSV (seja laranja) e zona sub-granular do giro denteado do hipocampo (seta verde). Fonte: (Bátiz et al., 2015)

No hipocampo adulto as células precursoras do giro denteado, atualmente conhecidas como células progenitoras neurais quiescentes (PNQ) têm o seu corpo celular localizado na zona subgranular (ZSG) e possuem como principal característica funcional baixa taxa de divisão. Evidências genéticas, bioquímicas e farmacológicas sugerem que essas células PNQ's (células do tipo I) seriam tipos especiais de astrócitos (radial glia-like precursors) que expressam proteína glial fibrilar ácida (GFAP- glial fibrillary acidic protein) e nestina (Fig.7) (Duan *et al.*, 2008). No processo de neurogênese, as células PNQ's atuam como células-

tronco dividindo-se assimetricamente e dando origem a progenitores neurais amplificadores (PNA), que proliferam rapidamente. Este tipo celular (células do tipo II) expressa nestina (filamento intermediário tipo IV) e SOX2, porém não mais expressa GFAP (Kempermann *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 2008). Menos de uma semana após seu nascimento, as PNA's param suas divisões e começam a expressar marcadores de neurônios imaturos e estender neuritos, sendo nessa etapa denominados de neuroblastos (Encinas e Sierra, 2012). Esses neuroblastos, os quais passam por um estágio de neurônios imaturos antes de se integrarem à circuitaria hipocampal como um neurônio granular maduro expressam uma proteína associada de microtúbulos, a doublecortina (DCX) (Ming e Song, 2011). É durante essa etapa de transição entre PNA e neuroblastos, que mais de 60% das novas células morrem por apoptose e são fagocitadas por microglia (Sierra *et al.*, 2010). A diferenciação neuronal é caracterizada pela expressão transitória de DCX e da proteína ligante de cálcio Calretinina, e a expressão de Proteína Nuclear Neuronal (NeuN), um marcador neuronal, e Calbindina (Kempermann, 2002; Duan *et al.*, 2008). A maior parte a formação axonal e dendrítica ocorre durante esse período (Ambrogini *et al.*, 2004). Para conclusão da diferenciação e maturação neuronal completa, é necessário que ocorra a integração sináptica dos novos neurônios. As células não recrutadas para maturação são eliminadas por apoptose (Dayer *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006).

Figura 7 – Linha do tempo do processo neurogênico contendo características morfofisiológicas de cada etapa celular. Fonte: (Duan et al., 2008)

A neurogênese adulta pode ser regulada tanto por fatores intrínsecos como fatores extrínsecos. Cada estágio da neurogênese adulta (proliferação, diferenciação, maturação e sobrevivência) pode ser regulado por estímulos diferentes, sendo que cada estímulo pode atuar em múltiplos alvos. As inúmeras combinações dos possíveis efeitos nos diferentes estágios do desenvolvimento neuronal e da interação de diferentes fatores torna a regulação da neurogênese adulta complexa (Abrous *et al.*, 2005; Bruel-Jungerman *et al.*, 2007). Um número crescente de estudos examina como fatores ambientais e/ou fatores comportamentais podem modular a neurogênese. Dentre os fatores extrínsecos que afetam a neurogênese destacam-se o enriquecimento ambiental (Kempermann *et al.*, 1997), a atividade física (Van

Praag *et al.*, 1999; Uda *et al.*, 2006), o stress (Gould *et al.*, 1997; Tanapat *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2003) e a dieta (Lindqvist *et al.*, 2006). Dentre os fatores intrínsecos destacam-se os fatores de crescimento, tais como Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF - Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Pencea *et al.*, 2001), o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF - Epidermal growth fator), o Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF - Fibroblast Growth Fator) (Kuhn *et al.*, 1997), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1 (IGF-1 - Insulin-like Growth Factor 1) (Aberg *et al.*, 2000), o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor) (Jin *et al.*, 2002) e os hormônios corticosterona (Cameron e Gould, 1994), estrogênio (Tanapat *et al.*, 1999) e testosterona (Brännvall *et al.*, 2005).

Referências indicam que o envelhecimento causa uma acentuada redução da proliferação celular na ZSG e ZSV (Rossi *et al.*, 2006). Pesquisas também identificaram que além de causar morte neuronal em diversas regiões cerebrais, incluindo córtex, hipocampo, septo e corpo caloso (Kraska *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014), a STZ reduz a neurogênese adulta diminuindo a taxa de proliferação de células no giro denteado do hipocampo (DG) (Jackson-Guilford *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008).

1.7 - Geleia Real

A geleia real (GR), uma substância produzida pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas operárias da espécie *Apis mellifera* tem mostrado ações neuroprotetoras significativas (Bogdanov, 2014). Na espécie de abelha *Apis mellifera* as abelhas rainhas são alimentadas por toda sua vida com geleia real e as abelhas operárias recebem este alimento durante um curto período de tempo durante a fase de vida larval (Fig.8). As abelhas rainhas vivem por 1-5 anos, mas abelhas operárias, que são derivadas do mesmo genoma diploide, vivem apenas durante 3-6 semanas. Além de viverem mais tempo, as abelhas rainhas são duas vezes maiores, possuem anatomia especializada para reprodução, e se desenvolvem mais rápido entre as fases de ovo a adulto (Fig.9). Todas estas diferenças são derivadas a partir de diferentes condições no ambiente de criação de larvas, e, principalmente da nutrição. Este cenário levanta a possibilidade de que a geleia real possui um agente promotor de longevidade para as rainhas (Page e Peng, 2001; Honda *et al.*, 2011).

Figura 8 – (A) Abelhas operárias trabalhando no favo da colmeia. (B) Abelha operária depositando geleia para nutrir a larva de uma futura abelha rainha.

Figura 9 – Características morfológicas das castas das abelhas da espécie *Apis mellifera*

As ações epigenéticas da geleia real influenciam o desenvolvimento das abelhas promovendo alterações na expressão gênica durante o período larval, incluindo alterações fenotípicas no cérebro e posteriormente no comportamento das abelhas. (Lyko *et al.*, 2010; Herb *et al.*, 2012). Estudos também mostram semelhanças moleculares e epigenéticas entre o cérebro de abelhas e humanos (Maleszka, 2008; Gabor Miklos e Maleszka, 2011) indicando que futuras descobertas relacionadas à neuroplasticidade das abelhas poderão relacionar-se com os mecanismos moleculares existentes no cérebro humano. Estudos que relacionam a qualidade nutricional com a variação da expressão gênica individual e a saúde cerebral vêm sendo realizados. Novas abordagens de pesquisa envolvendo nutrição, epigenética e neurociência vêm sendo propostas tendo como uma de suas referências os mecanismos epigenéticos no cérebro das abelhas (Dauncey, 2013).

Uma análise da sua composição química mostrou que GR compreende proteínas (incluindo as MRJP - Major Royal Jelly Proteins), açúcares, lipídios, vitaminas, aminoácidos essenciais, peptídeos e ácidos graxos, em conjunto com uma variedade de substâncias bioativas, incluindo a AMP N1-óxido, o ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA / HDEA), encontrados até hoje exclusivamente na geleia real (Honda *et al.*, 2011). Como trata-se de um

produto natural de composição bem rica, a geleia real oferece potencial de pesquisa para se encontrar novas substâncias com ações farmacológicas (Fig.10).

	g in 100 g	RDI (g/day)
Water	60-70	
Carbohydrates	11 - 23	320
Proteins	9 -18	50
Fat	3-8	80
Vitamins	mg /100g	RDI* (mg/day)
Niacin (B3)	4.5 – 19	15
Pyridoxin (B6)	0.2 – 5.5	1.4
Thiamin (B1)	0.1 – 1.7	1.1
Riboflavin (B2)	0.5 – 2.5	1.3
Pantothenic acid	3.6 – 23	6
Folic acid	0.01 – 0.06	0.4
Biotin (H)	0.15 – 0.55	0.045
Minerals	mg /100g	RDI* (mg/day)
Potassium (K)	200-1000	2000
Calcium (Ca)	25-85	1000
Magnesium (Mg)	20-100	350
Zink (Zn)	0.7-8	8.5
Iron (Fe)	1-11	12.5
Copper (Cu)	0.33-1.6	1.2

Amino acids
Valine
Glycine
Isoleucine
Leucine
Proline
Threonine
Serine
Methionine
Phenylalanine
Aspartic acid
Glutamic acid
Tyrosine
Lysine
Arginine
Tryptophan

Figura 10 – Composição nutricional e relação de aminoácidos encontrados na geleia real. Fonte: Composição nutricional (Bogdanov, 2014); Relação de aminoácidos (Bărnăuțiu, 2011)

Pesquisas apontam que a GR possui uma série de atividades farmacológicas, dentre elas: antioxidante, neurotrófica, anti-inflamatória, imunomoduladora, hipoglicemiante, antialérgica, tônica geral e antienvelhecimento (Pavel et al., 2011, Amirshahi et al., 2014). Vários estudos têm demonstrado a atividade antioxidante da GR, e que por estas razões, há mais de 30 anos, tem sido usada comercialmente em áreas relacionadas à alimentação saudável, medicina natural e cosméticos (Kanbur *et al.*, 2009). Além de dados experimentais, referências indicam o uso médico da geleia real (Bogdanov, 2014). Em Cuba os produtos das abelhas, incluindo a geleia real, são utilizados dentro do sistema oficial de Medicina Natural e Tradicional do país. Já na Rússia existem dados de resultados positivos do tratamento com geleia real em diversas enfermidades realizados em um hospital local (Fig.11).

Treated disease	Cases	
	Very good and good improvement	Cases with no improvement
Arteriosclerosis	27	6
Cerebral insufficiency	46	12
Climacterium	39	5
Hypertonia	21	8
Hypotony	16	5
Pediatric diseases	12	3
Poor blood circulation	35	11
Sexual disfunction (men)	26	5

Figura 11 – Uso médico da geleia real em hospital russo. Fonte: (Bogdanov, 2014)

A geleia real (GR) tem uma potente capacidade para melhorar situações de resistência à insulina e este é um efeito valioso em casos de DA (Zamami et al., 2008). Estudos mostraram que a GR tem atividade semelhante à insulina, e que sua estrutura molecular contém vários peptídeos semelhantes à insulina (Kramer et al., 1977). Em um estudo sobre os efeitos da ingestão oral de geleia real no metabolismo da glicose em seres humanos saudáveis, vinte voluntários foram submetidos ao teste padronizado via oral de tolerância à glicose (TOTG), o qual foi seguido de um segundo TOTG após a ingestão de 20g de geleia real. Os resultados demonstraram que os níveis de glicose no sangue dos voluntários foram reduzidos significativamente 2 horas após a ingestão da geleia real e que área sob a curva de glicose foi também significativamente inferior, indicando que na geleia real existem componentes que se mantêm bioativos após sua passagem pelo estômago (Münstedt et al., 2009).

Estudos neurocientíficos identificaram que a GR promove diversos efeitos positivos ao sistema nervoso. Foi demonstrado in vitro que um extrato de GR facilita a neurogênese, aumentando a diferenciação de células-tronco neurais em diferentes tipos de células cerebrais, incluindo neurônios (Hattori *et al.*, 2007b). Por outro lado, o mesmo trabalho também demonstrou que o 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA), um componente único da GR, aumentou a geração de neurônios e diminuiu a de astrócitos. Estas observações sugerem que a GR contém componentes diversos que influenciam diferentemente as linhagens de células neuronais ou gliais, e que 10-HDA é um dos componentes da GR que facilita a neurogênese mediante células-tronco neurais (Hattori *et al.*, 2007b). Quando administrada oralmente, a GR tem desempenhado papéis neurotróficos e neuroprotetores no hipocampo do cérebro do rato adulto (Hashimoto *et al.*, 2005). Resultados de pesquisas mostram que a GR seletivamente facilita a expressão de genes, a nível mRNA, do Fator Neurotrófico Derivado de Linhagem de Célula Glial (GDNF), um potente fator neurotrófico atuante no cérebro e do neurofilamento H (NF-H), um marcador específico predominantemente encontrado nos axônios neuronais hipocampo do cérebro do rato adulto (Hashimoto *et al.*, 2005). Estudos também demonstraram que tanto a GR como o componente 10-HDA proporcionaram efeitos positivos na redução de

sintomas de ansiedade e depressão em modelos de estresse induzido em roedores (Ito *et al.*, 2012). Experimentos *in vitro* demonstraram que células PC12 (células derivadas de uma linhagem clonal de feocromocitoma que exibem características de neurônios) incubadas com um extrato de GR induziu a formação de processos neurais nessas células (Hattori *et al.*, 2006). Neste estudo, os componentes ativos foram isolados e identificados como monofosfato de adenosina (AMP) e AMP N1-óxido, sendo que AMP N1-óxido era 20 vezes mais ativo que AMP. O AMP N1-óxido também suprimiu a proliferação de células PC12 e estimulou a expressão do neurofilamento M, uma proteína específica de neurônios maduros, demonstrando a atividade estimuladora de AMP N1-óxido induzir a diferenciação neuronal de células PC12 (Hattori *et al.*, 2006). Também foi demonstrado que a administração oral de GR é responsável pela regeneração e aumento do número de células granulares do giro denteado do hipocampo, e pela melhoria simultânea de processos cognitivos prejudicados pela administração de trimetilestanho (TMT), que provoca a morte neuronal aguda (Hattori *et al.*, 2011). Os dados apresentados sugerem que a administração oral da GR pode ser um caminho promissor para o melhoramento da função neuronal e regeneração de células granulares do hipocampo as quais atuam no processo de memória e cognição.

2 – Objetivos

Investigar os efeitos neuroprotetores e comportamentais do consumo oral da geleia real em ratos Wistar submetidos ao modelo icv-STZ através da análise dos seguintes parâmetros:

- a) Aprendizagem e memória espacial pelo teste do Labirinto Aquático de Morris;
- b) Ansiedade e comportamento exploratório utilizando o teste do Labirinto em Cruz Elevado;
- c) Neurodegeneração pela quantificação de morte neuronal;
- d) Estresse oxidativo medido pelo índice do ânion superóxido;
- e) Neurogênese pela análise da diferenciação e sobrevivência das células granulares do giro denteado do hipocampo;
- f) Análise da glicemia;
- g) Análise do peso corporal;
- h) Análise da taxa de mortalidade;

3 - Materiais e Métodos

3.1 – Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos com 2 meses de idade, pesando entre 220g a 250g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan. Os ratos receberam água e dieta ad libitum (ração para roedores – Nuvilab CR1®) e foram mantidos em condições ambientais padronizadas, com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro-escuro (luz ligada às 7h) em caixas de polietileno forradas com maravalha (4 animais por caixa). Os animais passaram por um período de 4 dias de adaptação ao ambiente antes de serem iniciados os experimentos. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Butantan (CEUAIB) sob o número de protocolo 1345/14.

3.2 - Geleia Real

Foi utilizada geleia real (GR) in natura, obtida da empresa apícola “Estação do Mel” e mantida a -80°C e ao abrigo da luz. Posteriormente, esta foi condicionada em tubos Eppendorf em frações de 350mg e mantida congelada à -20° C. Foi utilizada a dose diária de 200 mg/kg via oral (vo) por gavagem (Dieamant, 2003) durante 14 dias consecutivos à partir de 7 dias após a cirurgia. O dia de início do tratamento oral com geleia real foi definido conforme

estratégia de somente iniciar o tratamento após as lesões causadas pela injeção icv-STZ estarem estabelecidas nos grupos lesionados, e a duração do tratamento foi baseada em referências que indicaram o período necessário para a observação de efeitos da geleia real (Salkovic-Petrisic et al., 2013, Zamani et al., 2012). A dose diária de geleia real foi descongelada e diluída em água destilada na concentração de 100mg/ml. Os ratos de todos os grupos permaneceram 6 horas em jejum (7h – 13h) antes de receberem a GR ou água destilada (grupo Controle).

3.3 - Procedimento cirúrgico de injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (icv-STZ)

Os animais foram anestesiados com ketamina (130 mg/kg) e xilasina (13 mg/kg), sendo em seguida posicionados no aparelho estereotático. A cabeça do animal foi fixada no aparelho, o crânio exposto e 2 pequenos orifícios foram perfurados para que a injeção icv bilateral pudesse ser realizada. O ponto Bregma serviu de referência para as coordenadas definidas a partir do atlas de coordenadas estereotáticas de Paxinos e Watson (1998). As coordenadas definidas (ântero-posterior = -0,8 mm; medial-lateral = $\pm$ 1,5 mm e dorso-ventral = -3,8 mm) foram confirmadas com a realização de cortes histológicos do cérebro. A injeção icv bilateral foi feita com uma microseringa Hamilton de 5,0 μ l conectada ao aparelho estereotático. Foi administrado 3,0 mg/kg de estreptozotocina por animal (1,5 mg/kg por ventrículo). A solução de estreptozotocina foi preparada pela diluição da droga em solução fisiológica de Ringer 0,125 mg/ μ l, sendo que nesta concentração um animal com peso de 250g recebe 3,0 μ l de solução por ventrículo. A injeção icv foi realizada em um fluxo de 1 μ l/min. Após a injeção, a agulha foi mantida por mais 2 minutos com o objetivo de propiciar a difusão do líquido pelo ventrículo e evitar o refluxo. Os animais do grupo Controle foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos e receberam injeção icv de solução fisiológica de Ringer. Após a cirurgia os animais passaram por um período de recuperação de 3 dias alojados em gaiolas individuais com comida e água a vontade.

3.4 - Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

Grupo Controle (CTR) – Receberam solução Ringer (icv) e água destilada (vo).

Grupo Estreptozotocina (STZ) – Receberam estreptozotocina (icv) e água destilada (vo).

Grupo Geleia Real (GR) – Receberam solução Ringer (icv) e geleia real (vo).

Grupo Estreptozotocina - Geleia Real (STZ-GR) – Receberam estreptozotocina (icv) e geleia

real (vo).

3.5 - Testes comportamentais

3.5.1 - Labirinto Aquático de Morris

Foi utilizada uma piscina circular de 200 cm de diâmetro e 50 cm de altura, preenchida até 30 cm com água à temperatura de aproximadamente 25 °C. (Morris, 1984). Uma plataforma de acrílico transparente de 10 cm de diâmetro, colocada a 2 cm abaixo da superfície da água, servia de escape para os animais. A piscina estava teoricamente dividida em 4 quadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4), e ao longo da borda estavam marcadas as referências cardinais (N,S,L,O) para serem utilizadas como referenciais para o experimentador. Após o animal ser introduzido na piscina, este deveria aprender a chegar ao local da plataforma submersa em um período de até 2 minutos, tendo como referência visual as pistas externas próximas ao labirinto. Após encontrar a plataforma submersa, o animal permanecia em cima da plataforma por 15 segundos para reconhecimento do ambiente. Em cada dia de sessão de testes os animais eram submetidos a 4 tentativas de localização da plataforma. Caso na primeira tentativa da sessão de testes do dia, o animal não conseguisse encontrar a plataforma submersa, ele também era colocado sobre a plataforma pelo período de 15 segundos para reconhecimento do ambiente (Agrawal et al., 2009). O intervalo de tempo entre as tentativas (IET) foi padronizado em 2 categorias de testes, sendo uma com IET de 15 minutos (IET15) e outra com IET igual a “zero” (IET0), sendo este com retorno imediato do animal para a piscina. Após a finalização do teste, o animal era seco com uma toalha e devolvido para sua caixa moradia. Para a análise do aprendizado e memória espacial dos ratos foram utilizados os seguintes parâmetros: “Latência para Encontrar a Plataforma” (LAT), “Distância Percorrida” (DIST), “Velocidade Média do Percurso” (VELOC), “Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina” (%T-BORDA), “Porcentagem de Tempo no Quadrante Crítico”, quadrante onde está localizada a plataforma, (%T-QUAD)”, “Número de Entradas no Contador”, uma área de 30 cm de diâmetro a partir do centro da plataforma (N-ACONT), e “Porcentagem de Tempo na Área do Contador” (%T-A_CONT). O experimento foi registrado por uma câmera de vídeo conectada a um computador configurado com o software Maze HVS-Image (versão 2014) programado para analisar pares de coordenadas que definem a posição do animal coletadas a cada 0,1s. Para evitar efeitos circadianos no comportamento dos animais, todos os testes comportamentais foram realizados sempre no período vespertino, entre 14:00 e 18:00 h.

3.5.2 - Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado é constituído por 4 braços (plataformas) unidos em uma área central e dispostos entre si por um ângulo de 90°, caracterizando um formato de cruz. Esta estrutura permanece elevada a 70cm do nível do chão apoiado sobre 4 pernas. Cada braço mede 45 centímetros de comprimento por 10 cm de largura. Os braços fechados, opostos entre si possuem paredes de 40 cm de altura, e os braços abertos, opostos entre si, possuem paredes de apenas 1cm de altura. Na sessão de testes cada animal foi posicionado no centro do equipamento de frente para um dos braços abertos e observado durante 5 minutos. Para a análise da ansiedade e comportamento exploratório no Labirinto em Cruz Elevado foram coletados e avaliados os seguintes parâmetros: “Número de Entradas nos Braços Abertos” (ENTRADAS – BA), “Número de Entradas nos Braços Fechados” (ENTRADAS – BF), “Tempo de Permanência nos Braços Abertos” (TEMPO – BA), “Tempo de Permanência nos Braços Fechados” (TEMPO – BF) e “Tempo de Permanência na Área Central” (TEMPO – CE). Com base nestes parâmetros foi calculada para análise a “Porcentagem de Tempo de Permanência nos Braços Abertos” (% TEMPO – BA), parâmetro que usualmente é considerado como inversamente proporcional aos níveis de ansiedade dos animais. Além deste parâmetro, para análise dos resultados do experimento, o parâmetro “Número de Entradas nos Braços Fechados” (ENTRADAS – BF) é relacionado com o nível de atividade motora dos animais.

3.6 – Análises Histológicas

3.6.1 – Avaliação da Neurodegeneração – Análise histoquímica por Fluoro-Jade B

Para a marcação da neurodegeneração foi utilizado o método de Fluoro-Jade B, um tipo de fluorocromo, que pode detectar a degeneração neuronal. Este traçador possui alta afinidade por neurônios em degeneração, incluindo corpo celular, dendritos, axônios e terminais axônicos (Schmued e Hopkins, 2000). Os animais foram profundamente anestesiados com xilasina (1,5 mg/100 g) e ketamina (15 mg/100 g) e perfundidos intracardiacamente com 300 ml de tampão foscato salina (PBS – phosphate buffered saline) 0.1M, pH 7,4, seguido por 300 ml de paraformaldeído 4% em tampão foscato (PB – sodium phosphate buffer) 0,1 M, pH 7,4. O cérebro foi removido e pós-fixado por 4h no mesmo fixador a 4 °C e crioprotégido com solução de sacarose 30% (PB) por 48h à 4 °C. Foram feitas secções coronais (30 µm) cortadas em criostato (-21 °C) da região do hipocampo entre as

coordenadas -1,8mm e -4,8 mm a partir do Bregma (Paxinos e Watson, 1998). Os cortes coronais sequenciais foram armazenados em placas multipoços posteriormente montados em lâminas gelatinizadas. As lâminas gelatinizadas contendo os cortes foram deixadas em placa quente (37°C) para secar e foram reidratadas pela imersão em álcool 100% (3min), álcool 70% (1min) e água destilada (1min). Após o processo de reidratação o material foi incubado em uma solução de permanganato de potássio 0,06% por 15 minutos sob agitação para diminuição do ruído de fundo. Em seguida o material foi incubado protegido da luz em solução de Fluoro-Jade B (Chemicon) 0,001% e ácido acético 0,1% (30 min). Após a incubação com o Fluoro-Jade B, o material foi lavado por 3 vezes em água destilada (1 min) e deixado por 30 minutos em estufa para secar, e em seguida foi tratado com xilol durante 3 minutos por 2 vezes e coberto com lamínula utilizando DPX (Fluka, Milwaukee, WI, USA). Em seguida o material foi analisado em microscópio de fluorescência para captação da fluorescência verde (495-521nm). Imagens Digitais foram capturadas utilizando uma objetiva 10x de um microscópio (Nikon E1000, Melville, NY, USA) acoplado à câmera (Nikon DMX1200). Para análise da morte neuronal foram feitas contagens manuais dos corpos celulares dos neurônios em degeneração com o uso do software Image J® 1.49v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) em determinadas áreas (480.000 μm^2) localizadas nas regiões do giro denteado, CA1 e CA3 do hipocampo, córtex entorrinal e corpo estriado. As contagens das células foram realizadas em 6 secções do encéfalo de cada animal considerando os hemisférios direito e esquerdo.

3.6.2 - Avaliação de geração de espécies reativas de oxigênio – Análise da oxidação do DHE

O estresse oxidativo foi avaliado pelos níveis de espécies reativas de oxigênio no giro denteado do hipocampo. Os níveis de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) foram medidos pelo método de histoquímica, com a fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do dihidroetídeo (DHE). O DHE, forma reduzida do etídeo, entra livremente na célula e reage rapidamente com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ formando etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm) (Sharikabad *et al.*, 2001). A oxidação do DHE é quantitativamente proporcional à concentração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ na célula (Hernandes *et al.*, 2010). Os animais foram sacrificados por decapitação e seus encéfalos foram imersos em meio para congelamento (Leica Instruments) e em seguida congelados em gelo seco. Foram feitas secções coronais (30 μm) em criostato (-27 °C) na região do hipocampo entre as coordenadas -1,8mm e -4,8 mm a partir do Bregma (Paxinos e Watson, 1998), e os tecidos fatiados foram

colocados em lâminas gelatinizadas. As lâminas contendo os cortes foram mantidas congeladas à -20 °C até uso. Os cortes foram descongelados em placa quente (37°C) por 10 min em seguida circulados com caneta hidrofóbica. Os cortes do tecido foram incubados com tampão fosfato (PB) 0,1 M contendo o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) (100 µM) (10 min) para prevenir artefatos de reação de oxidação secundária e em seguida incubados com DHE (5 µM) diluído em PB contendo DTPA 100 µM, em câmara úmida (5 min), em temperatura ambiente, protegido de luz. A fluorescência dos cortes foi detectada em microscópio óptico Nikon com filtro para rodamina (480,586nm), com objetiva de 10x. Imagens digitais foram obtidas por meio de uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio. Os parâmetros usados para capturar as imagens digitais foram mantidos constantes. A fluorescência foi analisada pela medida de quantidade e intensidade óptica das marcações em uma área de 480.000 µm² localizada nas regiões CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo e em uma área de 240.000 µm² localizada na região do hilus. A análise automatizada foi realizada pelo software Image J® 1.49v (Wayne Rasband, National Institutes of Health/USA). As quantificações foram realizadas unilateralmente (hemisfério direito ou esquerdo), em 6 secções do encéfalo de cada animal.

3.6.3 - Avaliação da neurogênese (Parte 1) - Análise imuno-histoquímica

Nesta primeira etapa a neurogênese foi avaliada pela análise da diferenciação das células granulares do giro denteado do hipocampo. Para marcação das células foi utilizado o marcador “doublecortin” (DCX), o qual identifica neurônios imaturos em desenvolvimento. Estudos indicam que a expressão de DCX em neurônios acontece durante as primeiras 2 semanas de vida do neurônio (Mcdonald e Wojtowicz, 2005). Os animais foram profundamente anestesiados com xilasina (1,5 mg/100 g) e ketamina (15 mg/100 g) e perfundidos intracardiacamente com 300 ml de tampão fosfato salina (PBS – phosphate buffered saline) 0.1M, pH 7,4, seguido por 300 ml de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB – sodium phosphate buffer), 0,1 M, pH 7,4. O cérebro foi removido e pós-fixado por 4h no mesmo fixador à 4 °C e crioprotetido com solução de sacarose 30% (PB) por 48h à 4 °C. Foram feitas secções coronais (30 µm) cortadas em criostato (-21 °C) na região do hipocampo entre as coordenadas -1,8mm e -4,8 mm a partir do Bregma (Paxinos e Watson, 1998). Os cortes coronais sequenciais foram armazenados em placas de multipos. A imunohistoquímica para DCX foi realizada nessas secções de acordo com o método de (Diniz *et al.*, 2013). Os cortes foram lavados sob agitação em solução PB 0,1 M, pH 7,4 (3 x 10min) e em seguida foram pré-incubados por 1h em solução 10% de Soro Normal de Jumento -

(Normal Donkey Serum - NDS) (Jackson Immuno Research Lab, USA) diluídos em tampão fosfato (PB) 0,1 M contendo 0,3% de Triton X-100 para evitar ligações inespecíficas. Os cortes foram novamente lavados e subsequentemente foram incubados com anticorpo primário policlonal de cabra (1:100, cabra anti-DCX, Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA) por 48h. Após incubação primária, as secções foram lavadas e posteriormente incubadas com um anticorpo secundário (1:200, jumento anti-cabra, Jackson Immuno Research Lab, EUA) em PB 0,1 M contendo 0,3% de Triton X-100 durante 2 h, seguida de nova lavagem. Em seguida foi aplicado o protocolo de imunoperoxidase. Primeiramente foi realizada a incubação de 2 horas com o complexo avidina-biotina-peroxidase ABC (ABC Elite Kit, Vector Labs, EUA) para ampliar as ligações do marcador. As secções em seguida foram submersas em Diaminobenzidina (DAB) 0,05 %, sendo em seguida adicionada uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,03% com PB 0,1 M. Posteriormente as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas as quais foram mantidas em placa quente (37°C) para secar. Após 24h, as secções foram mergulhadas em uma solução de 0,05% de tetróxido de ósmio para intensificação da marcação DAB e após estarem secas, as secções foram desidratadas (álcool 70%, 90% e absoluto) e cobertas com uma lamínula utilizando Permount (Fisher, EUA). Imagens digitais foram capturadas utilizando uma objetiva 10x de um microscópio de luz (Nikon E1000, Melville, NY, USA) acoplado à câmera (Nikon DMX1200). Para análise das células marcadas foram capturadas imagens em uma área de 480.000 μm^2 , localizada na região do giro dentado do hipocampo. Em seguida foram feitas contagens manuais dos corpos celulares dos neurônios DCX-positivos com o uso do software Image J® 1.49v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). As contagens das células foram realizadas em 6 secções do encéfalo de cada animal, sendo considerado os hemisférios direito e esquerdo.

3.6.4 - Avaliação da neurogênese (Parte 2) – Análise imuno-histoquímica

Na segunda etapa, a neurogênese foi avaliada pela análise da sobrevivência dos novos neurônios granulares do giro dentado do hipocampo. Para marcação das células foi utilizado o marcador BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine). O BrdU é análogo à timidina, que marca o DNA durante fase S do ciclo celular (Wojtowicz e Kee, 2006; Azizi e Vendrame, 2007). No décimo quarto dia após a cirurgia de injeção icv (sete dias após o início da administração oral de geléia real), os animais receberam administração intraperitoneal de BrdU (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na dose 200mg/kg. Foram administradas 2 injeções de 200mg/kg (0h + 12h) para garantir que a maioria das células em divisão fossem marcadas. Vinte e um dias após a administração das injeções de BrdU, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão

transcardíaca, sendo os cérebros removidos, pós-fixados e cortados como descrito anteriormente. Após três lavagens (10 minutos cada) em PBST (salina tamponada com 0,1% Triton X-100). Para detecção do Brdu, o material foi inicialmente tratado/desnaturado com 2N HCl por 1 hora. Após 3 lavagens de 10 minutos cada em PBST, o material foi tratado com tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 0,1M a 4°C por 10 minutos e lavado com PBST (3 x 10min) (Girardi *et al.*, 2002). Os cortes foram então pré-incubados overnight com soro normal de cabra a 30% e posteriormente incubados com o anticorpo monoclonal anti-BrdU (Sigma, St. Louis, MO, EUA) de rato diluído a 1:200 em PBST por 48h à temperatura ambiente. Após três lavagens em PBST (3 x 10min), os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-rato feito em cabra (Jackson Immuno Research Lab., Pennsylvania, EUA) diluído a 1:200 em PBST por 2 horas. Posteriormente foi realizado o protocolo de imunoperoxidase como descrito anteriormente. Imagens digitais foram capturadas utilizando uma objetiva 10x de um microscópio de luz (Nikon E1000, Melville, NY, USA) acoplado à câmera (Nikon DMX1200). Para análise das células marcadas foram capturadas imagens em uma área de 480.000 μm^2 , localizada na região do giro denteado do hipocampo. Em seguida foram feitas contagens manuais dos corpos celulares dos neurônios Brdu-positivos com o uso do software Image J® 1.49v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). As contagens das células foram realizadas em 6 secções do encéfalo de cada animal, sendo considerado os hemisférios direito e esquerdo.

3.7 – Níveis de glicose no sangue periférico

Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica estéril, uma gota de sangue foi obtida através da perfuração da ponta da cauda dos animais. Essa amostra de sangue, foi aplicada sobre a fita teste que foi introduzida para leitura no glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche), sendo os resultados obtidos em mg/dL.

3.8 – Peso corporal

Os ratos foram pesados semanalmente a partir do dia da cirurgia de injeção icv-STZ (considerado dia “zero” na linha do tempo), e a variação dos pesos foi definido a partir do percentual de variação com relação ao peso verificado no dia da cirurgia.

3.9 – Taxa de Mortalidade

A taxa percentual de mortalidade dos animais foi calculada ao final do período de testes.

3.10 – Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados obtidos nos testes comportamentais do Labirinto aquático de Morris utilizou-se a análise de variância ANOVA de três vias, seguido do pós-teste de Bonferroni com uso do software IBM SPSS Statistics v23. Para a análise estatística do teste comportamental do Labirinto em Cruz Elevado e das análises histológicas de neurogênese, neurodegeneração, estresse oxidativo, glicemia, peso corporal e taxa de mortalidade utilizou-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni com uso do software GraphPadPrism v5. O nível de significância foi fixado em 5% ($P < 0,05$).

4 - Delineamento experimental

Todos os grupos experimentais foram submetidos aos mesmos procedimentos de testes comportamentais e análise histológica. Todos os experimentos foram realizados de forma padronizada, dentro de um mesmo período na linha do tempo (Fig.12) e mesma faixa de horário.

Figura 12 – Esquema Experimental

4.1 – Avaliação do aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris

A fase de aprendizado da tarefa foi feita por um período de 4 dias consecutivos, antes dos procedimentos cirúrgicos de injeção icv. Em cada sessão de treinamento diário (S1 à S4), os animais realizavam 4 tentativas de localização da plataforma (T1 à T4). Os animais eram introduzidos na piscina a partir de pontos diferentes da borda a cada tentativa, conforme descrito no item 3.5.1. A plataforma submersa permanecia no mesmo quadrante/local durante toda a sessão de um mesmo dia, mas a cada dia (sessão de treinamento) a plataforma mudava de localização/quadrante. A fase de teste de memória espacial dos animais iniciou-se 4 dias após os procedimentos cirúrgicos de injeção icv. Foram realizadas 7 sessões de testes (S5 à S11) contendo as mesmas características apresentadas na fase de aprendizado. As sessões de testes (S5 à S11) foram realizadas respectivamente com 4, 6, 11, 13, 16, 18 e 20 dias após os procedimentos cirúrgicos de icv. Os dados coletados foram analisados separadamente em 3 períodos distintos. O Período P1 apresenta dados dos 4 dias (S1 à S4) que antecederam a cirurgia icv (dia -4 ao dia -1). Neste Período nenhum animal foi submetido a qualquer tratamento. O Período P2 apresenta dados referente aos 6 primeiros dias após a cirurgia icv (dia 1 ao dia 6), no qual foram realizadas 2 sessões de testes (S5 e S6), respectivamente nos dias 4 e 6 após cirurgia. Neste período foi avaliado o efeito da cirurgia de injeção icv no desempenho de aprendizado e memória espacial operacional dos animais. O Período P3 apresenta dados referentes do período entre o sétimo ao vigésimo dia após a cirurgia, no qual foram realizadas 5 sessões (S7 à S11) realizadas nos dias 11, 13, 16, 18 e 20 após cirurgia. Neste período, além dos efeitos da cirurgia icv foi também avaliado o efeito ao longo do tratamento oral com a geleia real no desempenho do aprendizado e memória espacial dos animais.

4.2 – Avaliação de ansiedade e comportamento exploratório no Labirinto em Cruz Elevado

Cada animal foi submetido à uma sessão de teste com duração de 5 minutos. Este experimento foi realizado 15 dias após os procedimentos cirúrgicos de injeção icv, no período vespertino, no horário entre as 14:00 e 18:00h. Antes de cada animal ser testado os aparatos foram limpos com etanol 5% para evitar interferências olfativas nos testes.

4.3 - Análises Histológicas

A análise histológica da avaliação da neurodegeneração, avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio e avaliação da diferenciação das células granulares do giro denteado do hipocampo foram iniciadas 21 dias após os procedimentos cirúrgicos de injeção icv, sendo estes procedimentos descritos respectivamente nos itens 3.6.1, 3.6.2, e 3.6.3. Avaliação da sobrevivência das células granulares do giro denteado do hipocampo foi iniciada 21 dias após as injeções de Brdu, sendo os procedimentos descritos no item 3.6.4.

4.4 – Análise da glicemia

As dosagens para análise da glicemia foram feitas 17 dias após a cirurgia da injeção icv, sendo os procedimentos descritos no item 3.7.

5 - Resultados

5.1 – Avaliação do aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris – Intervalo de tempo entre as tentativas de 15 minutos (IET15)

Nos testes realizados utilizando o tempo de intervalo entre as tentativas igual a 15 minutos (IET15), os resultados do Período P1, apresentados na Tabela 1, mostram que para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST), Velocidade Média do Percurso (VELOC), Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), Porcentagem de tempo no Quadrante Crítico (%T-QUAD), Número de Entradas na Área do Contador (N-ACONT) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) a ANOVA revelou a existência de efeito significativo para o fator Tentativa [$F(3,492) = 2,75-64,69$; $p < 0,05$] e inexistência de efeito significativo para o fator Grupo [$F(3,492) = 0,19-0,74$; $p > 0,53$]. O efeito significativo para o fator Tentativa indica que os animais apresentaram uma curva de aprendizado ao longo das Tentativas e a inexistência de efeito do fator Grupo indica que todos os grupos apresentaram desempenho semelhante, validando a equivalência entre os grupos antes dos procedimentos cirúrgicos e do tratamento oral com a geleia real. A ANOVA também revelou existência de efeito significativo para o fator Dia [$F(3,492) = 5,99-49,32$; $p < 0,05$] para os parâmetros Latência (LAT), Distância Percorrida (DIST), Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), Número de Entradas na Área do Contador (N-ACONT) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT), indicando que os animais apresentaram melhora de desempenho ao longo das sessões diárias de testes realizados dentro deste período.

Tabela 1 – Resultados do Teste de Memória no Período P1 – IET15

PARÂMETRO	GRUPO		TENTATIVA		TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,492	P	F 3,492	P	F 3,492	P
LAT	---	---	49,48	< 0,001	---	---
DIST	---	---	40,934	< 0,001	---	---
VELOC	---	---	2,75	0,048	---	---
%T-BORDA	---	---	64,691	< 0,001	---	---
%T-QUAD	---	---	31,558	< 0,001	---	---
N-ACONT	---	---	6,268	0,001	---	---
%T-A_CONT	---	---	29,173	< 0,001	---	---

PARÂMETRO	DIA		DIA / GRUPO		DIA / TENTAVIA		DIA / TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,492	P	F 3,492	P	F 3,492	P	F 3,492	P
LAT	18,287	< 0,001	---	---	---	---	---	---
DIST	16,951	< 0,001	---	---	---	---	---	---
VELOC	---	---	---	---	---	---	---	---
%T-BORDA	49,327	< 0,001	---	---	3,706	< 0,001	---	---
%T-QUAD	---	---	2,224	0,028	5,972	< 0,001	---	---
N-ACONT	5,998	0,001	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	21,827	< 0,001	---	---	1,93	0,048	---	---

Ao observarmos a Figura 13 é possível notar que todos os grupos apresentaram curva de aprendizado semelhante, indicando melhora de desempenho ao longo das tentativas realizadas no Período P1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P1

Figura 13 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 4 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 14 apresenta o desempenho entre tentativas de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P1

Figura 14 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 4 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à T1.

A Figura 15 apresenta o desempenho ao longo das sessões (dias de testes) para parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P1, indicando a evolução de desempenho semelhante entre os grupos experimentais

Figura 15 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 16 apresenta o desempenho entre sessões dos de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P1

Figura 16 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S1.

Os resultados do Período P2 nos permitem analisar os efeitos da injeção icv-de STZ no 4º e 6º dia após os procedimentos cirúrgicos. Os dados apresentados na Tabela 2, mostram que para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST), Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), Porcentagem de tempo no Quadrante Crítico (%T-QUAD) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) a ANOVA revelou a existência de efeito significativo para o fator Grupo [$F(3,244) = 4,83-14,31$; $p < 0,05$], e para o fator Tentativa [$F(3,244) = 5,20-13,33$; $p < 0,05$] foi demonstrada nos parâmetros, com exceção de %T-BORDA. No Período P2 a ANOVA revelou ausência de efeito significativo para o fator Dia [$F(3,244) = 0,06-2,52$; $p > 0,12$] indicando que os animais não apresentaram alteração de desempenho ao longo das sessões de testes dentro deste período. O efeito significativo para o fator Tentativa indica que os animais aprenderam a tarefa e memorizaram o local da plataforma ao longo das tentativas. O efeito significativo para o fator Grupo mostra que houve diferença de aprendizado entre os grupos. O pós-teste de Bonferroni mostra que os animais dos grupos que receberam injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) apresentaram prejuízos de aprendizado e memória quando comparados aos animais dos grupos que receberam injeção icv de solução fisiológica (CTR e GR) ($p < 0,05$) (Fig.17).

Tabela 2 – Resultados do Teste de Memória no Período P2 – IET15

PARÂMETRO	GRUPO		TENTATIVA		TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,244	P	F 3,244	P	F 3,244	P
LAT	14,313	< 0,001	7,579	< 0,001	---	---
DIST	11,825	< 0,001	5,209	0,002	---	---
VELOC	---	---	---	---	---	---
%T-BORDA	4,831	0,008	---	---	---	---
%T-QUAD	6,231	0,002	13,338	< 0,001	---	---
N-ACONT	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	8,934	< 0,001	9,811	< 0,001	---	---

PARÂMETRO	DIA		DIA / GRUPO		DIA / TENTAVIA		DIA / TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,244	P	F 3,244	P	F 3,244	P	F 3,244	P
LAT	---	---	---	---	---	---	---	---
DIST	---	---	---	---	---	---	---	---
VELOC	---	---	---	---	---	---	---	---
%T-BORDA	---	---	---	---	---	---	---	---
%T-QUAD	---	---	---	---	---	---	---	---
N-ACONT	---	---	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	---	---	---	---	---	---	---	---

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P2

Figura 17 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 2 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S5 a S6) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 18 apresenta o desempenho entre tentativas de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P2.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P2

Figura 18 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 2 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S5 a S6) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à T1.

A Figura 19 apresenta o desempenho ao longo das sessões (dias de testes) para parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P2, na qual é possível notar a diferença de desempenho entre grupos que receberam injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) e os grupos que receberam injeção icv de solução fisiológica (CTR e GR).

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P2

Figura 19 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S5 a S6) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 20 apresenta o desempenho entre sessões dos de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P2.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P2

Figura 20 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S5 a S6) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S5.

Os resultados do Período P3 nos permitem analisar os efeitos da injeção icv-STZ e os efeitos da administração prolongada de geleia real sobre o desempenho de ratos em tarefas de memória operacional no labirinto de Morris. Os dados apresentados na Tabela 3 mostram que para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST), Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), Porcentagem de tempo no Quadrante Crítico (%T-QUAD) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) a ANOVA revelou a existência de efeito significativo para o fator Grupo [$F(3,616) = 6,32-11,17$; $p < 0,05$], e para o fator Tentativa [$F(3,616) = 16,73-41,66$; $p < 0,05$]. O efeito significativo para a Tentativa indica que os animais aprenderam a tarefa e memorizaram o local da plataforma ao longo das tentativas. A ANOVA também revelou existência de efeito significativo para o fator Dia [$F(3,616) = 5,99-49,32$; $p < 0,05$] para os parâmetros Latência (LAT), Distância Percorrida (DIST), Velocidade Média do Percurso (VELOC), Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), Número de Entradas na Área do Contador (N-ACONT) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT), indicando que os animais apresentaram melhora de desempenho ao longo das sessões de testes realizados dentro deste período. O efeito significativo para o fator Grupo mostra que houve diferença de aprendizado entre os grupos. O pós-teste de Bonferroni mostra que os animais dos grupos que receberam injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) apresentaram prejuízos de aprendizado e memória quando comparados aos animais dos grupos que receberam injeção de solução fisiológica (CTR e GR) ($p < 0,05$) e que o tratamento oral com GR não foi capaz de produzir alterações no desempenho dos animais (Fig.21).

Tabela 3 – Resultados do Teste de Memória no Período P3 – IET15

PARÂMETRO	GRUPO		TENTATIVA		TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,616	P	F 3,616	P	F 3,616	P
LAT	10,865	< 0,001	41,663	< 0,001	4,378	< 0,001
DIST	11,178	< 0,001	38,468	< 0,001	2,724	0,008
VELOC	---	---	---	---	---	---
%T-BORDA	8,431	< 0,001	16,73	< 0,001	---	---
%T-QUAD	6,325	0,002	40,581	< 0,001	3,201	0,002
N-ACONT	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	8,732	< 0,001	40,589	< 0,001	4,844	< 0,001

PARÂMETRO	DIA		DIA / GRUPO		DIA / TENTAVIA		DIA / TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,616	P	F 3,616	P	F 3,616	P	F 3,616	P
LAT	3,589	0,009	---	---	---	---	---	---
DIST	5,532	< 0,001	---	---	---	---	---	---
VELOC	3,996	0,005	---	---	---	---	---	---
%T-BORDA	8,848	< 0,001	3,05	0,001	4,224	< 0,001	---	---
%T-QUAD	---	---	---	---	---	---	---	---
N-ACONT	3,618	0,008	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	2,801	0,029	---	---	1,989	0,025	---	---

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P3

Figura 21 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 5 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S7 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 22 apresenta o desempenho entre tentativas de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P3.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P3

Figura 22 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 5 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S7 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à T1.

A Figura 23 apresenta o desempenho ao longo das sessões (dias de testes) para parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P3.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P3

Figura 23 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S7 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 24 apresenta o desempenho entre sessões dos de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P3.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P3

A Figura 25 apresenta uma visão integrada da curva de desempenho dos animais nos parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11). É possível notar a equivalência de desempenho entre os 4 grupos experimentais (CTR, GR, STZ, e STZ-GR) no Período P1, período pré-cirurgia. Nos Períodos P2 e P3, quando avaliamos o desempenho dos animais do 4º ao 20º dia após a cirurgia de injeção intracerebroventricular, é possível observar a redução de desempenho dos animais dos grupos que receberam injeção icv de estreptozotocina (STZ e STZ-GR) com relação aos animais que receberam injeção icv de solução fisiológica (CTR e GR). Vemos que o tratamento prolongado com a GR não alterou o prejuízo induzido STZ.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Figura 25 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial nos Períodos P1 (S1-S4), P2 (S5-S6) e P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA de 3 vias) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

As Figuras 26, 27 e 28 apresentam respectivamente o desempenho entre sessões dos de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11).

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Figura 26 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro Latência ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Figura 27 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro Distância Percorrida ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Figura 28 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro % Tempo do Contador ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a 15 minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S1.

5.2 – Avaliação do aprendizado e memória espacial no Labirinto Aquático de Morris – Intervalo de tempo entre as tentativas igual a “zero” (IET0)

Nos testes realizados utilizando o tempo de intervalo entre as tentativas igual a “zero” (IET0), os testes do Período P1, apresentados na Tabela 4, mostram que para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST), Velocidade Média do Percurso (VELOC), Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), Porcentagem de tempo no Quadrante Crítico (%T-QUAD) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) a ANOVA revelou a existência de efeito significativo para o fator Tentativa [$F(3,412) = 3,83-47,90$; $p < 0,05$] e inexistência de efeito significativo para o fator Grupo [$F(3,412) = 0,12-2,82$; $p > 0,06$]. O efeito significativo para o fator Tentativa indica que os animais apresentaram uma curva de aprendizado ao longo das Tentativas e a inexistência de efeito do fator Grupo indica que todos os grupos apresentaram desempenho semelhante, validando a equivalência entre os grupos antes dos procedimentos cirúrgicos e do tratamento oral com a geleia real. A ANOVA também revelou existência de efeito significativo para o fator Dia [$F(3,412) = 2,94-31,69$; $p < 0,05$] para os parâmetros Latência (LAT), Distância Percorrida (DIST), Velocidade Média do Percurso (VELOC), Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), Porcentagem de tempo no Quadrante Crítico (%T-QUAD), Número de Entradas na Área do Contador (N-ACONT) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT), indicando que os animais apresentaram melhora de desempenho ao longo das sessões diárias de testes realizados dentro deste período.

Tabela 4 – Resultados do Teste de Memória no Período P1 – IET0

PARÂMETRO	GRUPO		TENTATIVA		TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,412	P	F 3,412	P	F 3,412	P
LAT	---	---	40,214	< 0,001	---	---
DIST	---	---	32,174	< 0,001	---	---
VELOC	---	---	4,647	0,005	---	---
%T-BORDA	---	---	47,905	< 0,001	---	---
%T-QUAD	---	---	3,839	0,014	---	---
N-ACONT	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	---	---	15,278	< 0,001	---	---

PARÂMETRO	DIA		DIA / GRUPO		DIA / TENTAVIA		DIA / TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,412	P	F 3,412	P	F 3,412	P	F 3,412	P
LAT	21,018	< 0,001	---	---	---	---	---	---
DIST	31,699	< 0,001	---	---	2,618	0,007	---	---
VELOC	10,198	< 0,001	---	---	---	---	---	---
%T-BORDA	8,276	< 0,001	---	---	3,031	0,002	---	---
%T-QUAD	7,023	< 0,001	---	---	2,74	0,005	---	---
N-ACONT	11,209	< 0,001	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	2,941	0,04	---	---	---	---	---	---

Ao observarmos a Figura 29 é possível notar que todos os grupos apresentaram curva de aprendizado semelhante, indicando melhora de desempenho ao longo das tentativas realizadas no Período P1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P1

Figura 29 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 4 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 30 apresenta o desempenho entre tentativas de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P1

Figura 30 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 4 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à T1.

A Figura 31 apresenta o desempenho ao longo das sessões (dias de testes) para parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P1, indicando a evolução de desempenho semelhante entre os grupos experimentais

Figura 31 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 32 apresenta o desempenho entre sessões dos de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P1

Figura 32 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média ± erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S1.

Os resultados do Período P2 nos permitem analisar os efeitos da injeção icv-de STZ no 4º e 6º dia após os procedimentos cirúrgicos. Os resultados do Período P2, apresentados na Tabela 5, mostram que para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST), Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), Porcentagem de tempo no Quadrante Crítico (%T-QUAD) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) a ANOVA revelou a existência de efeito significativo para o fator Grupo [$F(3,204) = 7,10-20,49$; $p < 0,05$], e para o fator Tentativa [$F(3,204) = 5,20-19,10$; $p < 0,05$]. No Período P2 a ANOVA revelou ausência de efeito significativo para o fator Dia [$F(3,204) = 0,03-1,15$; $p > 0,86$] indicando que os animais não apresentaram alteração de desempenho ao longo das sessões de testes dentro deste período. O efeito significativo para o fator Tentativa indica que os animais aprenderam a tarefa e memorizaram o local da plataforma ao longo das tentativas. O efeito significativo para o fator Grupo mostra que houve diferença de aprendizado entre os grupos. O pós-teste de Bonferroni mostra que os animais dos grupos que receberam injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) apresentaram prejuízos de aprendizado e memória quando comparados aos animais dos grupos que receberam injeção icv de solução fisiológica (CTR e GR) ($p < 0,05$) (Fig. 33).

Tabela 5 – Resultados do Teste de Memória no Período P2 – IET0

PARÂMETRO	GRUPO		TENTATIVA		TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,204	P	F 3,204	P	F 3,204	P
LAT	20,495	< 0,001	9,806	< 0,001	---	---
DIST	10,145	< 0,001	19,104	< 0,001	---	---
VELOC	---	---	5,205	0,003	---	---
%T-BORDA	8,856	0,001	10,053	< 0,001	2,082	0,044
%T-QUAD	---	---	3,945	0,012	---	---
N-ACONT	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	7,103	0,002	7,381	< 0,001	---	---

PARÂMETRO	DIA		DIA / GRUPO		DIA / TENTAVIA		DIA / TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,204	P	F 3,204	P	F 3,204	P	F 3,204	P
LAT	---	---	---	---	---	---	---	---
DIST	---	---	---	---	---	---	---	---
VELOC	---	---	4,127	0,019	---	---	---	---
%T-BORDA	---	---	---	---	---	---	---	---
%T-QUAD	---	---	---	---	---	---	---	---
N-ACONT	---	---	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	---	---	---	---	---	---	---	---

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P2

Figura 33 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=68); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 2 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S5 a S6) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 34 apresenta o desempenho entre tentativas de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P2.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P2

Figura 34 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 2 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S5 a S6) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à T1.

A Figura 35 apresenta o desempenho ao longo das sessões (dias de testes) para parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P2, na qual é possível notar a diferença de desempenho entre grupos que receberam injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) e os grupos que receberam injeção icv de solução fisiológica (CTR e GR).

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P2

Figura 35 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S5 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 36 apresenta o desempenho entre sessões dos de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P2.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P2

Figura 36 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S5 a S6) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S5.

Os resultados do Período P3 nos permitem analisar os efeitos da injeção icv-STZ e os efeitos da administração prolongada de geleia real sobre o desempenho de ratos em tarefas de memória operacional no labirinto de Morris. Os dados apresentados na Tabela 6, mostram que para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST), Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), Porcentagem de tempo no Quadrante Crítico (%T-QUAD), e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) a ANOVA revelou a existência de efeito significativo para o fator Grupo [$F(3,516) = 7,27-14,20$; $p < 0,05$], e a existência de efeito significativo para o fator Tentativa [$F(3,516) = 12,11-72,31$; $p < 0,05$] foi demonstrada pelos mesmos parâmetros, além do parâmetro Velocidade Média do Percorso (VELOC). O efeito significativo para a Tentativa indica que os animais aprenderam a tarefa e memorizaram o local da plataforma ao longo das tentativas. No Período P3 a ANOVA revelou existência de efeito significativo para o fator Dia [$F(3,516) = 3,18-4,05$; $p < 0,05$] para os parâmetros Latência (LAT) e Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA), indicando que os animais apresentaram melhora de desempenho ao longo das sessões de testes realizados dentro deste período. O efeito significativo para o Grupo indica que houve diferença de aprendizado entre os grupos. O pós-teste de Bonferroni mostra que os animais dos grupos que receberam injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) apresentaram prejuízos de aprendizado e memória quando comparados aos animais dos grupos que receberam injeção de solução fisiológica (CTR e GR) e que o tratamento oral com geleia foi capaz de melhorar o desempenho dos animais ($p < 0,05$). Ao observarmos a Figura 37 é possível notar que os animais do grupo STZ apresentam desempenho reduzido quando comparados aos demais grupos, e que o tratamento com geleia real produziu notória melhora de desempenho dos animais do grupo STZ-GR e com significância estatística nos parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT) e Porcentagem de Tempo na Borda da Piscina (%T-BORDA) ($p < 0,05$) (Fig.37).

Tabela 6 – Resultados do Teste de Memória no Período P3 – IET0

PARÂMETRO	GRUPO		TENTATIVA		TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,516	P	F 3,516	P	F 3,516	P
LAT	14,209	< 0,001	65,537	< 0,001	3,809	0,001
DIST	10,284	< 0,001	72,31	< 0,001	---	---
VELOC	---	---	12,117	< 0,001	---	---
%T-BORDA	9,376	< 0,001	17,041	< 0,001	2,169	0,036
%T-QUAD	7,271	0,002	40,289	< 0,001	3,063	0,004
N-ACONT	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	8,833	0,001	28,511	< 0,001	3,097	0,004

PARÂMETRO	DIA		DIA / GRUPO		DIA / TENTAVIA		DIA / TENTATIVA / GRUPO	
	F 3,516	P	F 3,516	P	F 3,516	P	F 3,516	P
LAT	4,056	0,005	---	---	---	---	---	---
DIST	---	---	---	---	---	---	---	---
VELOC	---	---	2,871	0,002	1,864	0,039	---	---
%T-BORDA	3,185	0,017	---	---	3,724	< 0,001	1,629	0,017
%T-QUAD	---	---	---	---	3,248	< 0,001	1,518	0,036
N-ACONT	---	---	---	---	---	---	---	---
%T-A_CONT	---	---	---	---	---	---	---	---

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P3

Figura 37 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 5 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S7 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 38 apresenta o desempenho entre tentativas de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P3.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P3

Figura 38 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em 5 sessões de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S7 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à T1.

A Figura 39 apresenta o desempenho ao longo das sessões (dias de testes) para parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P3.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P3

Figura 39 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S7 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

A Figura 40 apresenta o desempenho entre sessões dos de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) no Período P3.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS PERÍODO P3

Figura 40 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S7 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S7.

A Figura 41 apresenta numa visão integrada a variação desempenho dos animais nos parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11). É possível notar a equivalência de desempenho entre os 4 grupos experimentais (CTR, GR, STZ, e STZ-GR) no Período P1. No Período P2, após a cirurgia de injeção intracerebroventricular, é possível observar a redução de desempenho dos animais que receberam injeção icv de estreptozotocina (STZ e STZ-GR) com relação aos animais que receberam injeção icv de solução fisiológica (CTR e GR). No Período P3, durante o tratamento oral com geleia real é possível observar a melhora gradual do desempenho dos animais do grupo STZ-GR.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Figura 41 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial nos Períodos P1 (S1-S4), P2 (S5-S6) e P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET15). CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=7); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA de 3 vias) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

As Figuras 42, 43 e 44 apresentam respectivamente o desempenho entre sessões dos de cada grupo para os parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A_CONT) ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11).

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Figura 42 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro Latência ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Figura 43 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro Distância Percorrida ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S1.

TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Figura 44 – Pós-teste do desempenho dos animais entre as sessões no teste de Labirinto Aquático de Morris da memória operacional espacial para o parâmetro % Tempo do Contador ao longo das sessões de testes realizadas no Período P1 (S1-S4), Período P2 (S5-S6) e Período P3 (S7-S11) utilizando tempo de intervalo entre tentativas igual a zero minutos (IET0). CTR (n=6); GR (n=6); STZ (n=7); STZ-GR (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro tentativas de cada sessão diária de testes. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos, seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação à S1.

5.3 – Avaliação de ansiedade e comportamento exploratório no Labirinto em Cruz Elevado

Conforme ANOVA, os resultados do Teste do Labirinto em Cruz Elevado demonstram que não houve diferenças significantes em nenhum dos parâmetros observados, tanto no fator Lesão STZ [$F(3,28) = 0,077-5,077$; $p > 0,782$], quanto ao fator Tratamento GR [$F(3,28) = 0,070-1,72$; $p > 0,792$], indicando que a injeção icv-STZ e o tratamento oral com GR não produziram alterações nos níveis de ansiedade e comportamento exploratório dos animais (Fig.45).

Figura 45 – Efeitos da injeção icv-STZ ou solução fisiológica e da administração oral da geleia real ou água destilada avaliados no teste de Labirinto em Cruz Elevado. CTR (n=7); GR (n=8); STZ (n=8); STZ-GR (n=9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

5.4 – Avaliação de neurodegeneração

No giro denteado (GD) e áreas CA1 e CA3 do hipocampo não foram encontradas marcações de neurodegeneração nos animais que receberam injeção icv de solução fisiológica (grupos CTR e GR). No córtex entorrinal e corpo estriado não foram observadas marcações de neurodegeneração em nenhum dos grupos.

Conforme ANOVA, no GD foi observado efeito significativo do fator Lesão STZ na geração de processo neurodegenerativo [$F(3,16) = 115,9$; $p < 0,001$] e efeito significativo do fator Tratamento GR [$F(3,16) = 7,836$; $p = 0,01$], indicando que a GR foi capaz de reduzir os níveis de neurodegeneração causados pela injeção icv-STZ (Fig.46).

Figura 46 – (A) Quantificação de neurodegeneração (células FJ-positivas) no giro denteado do hipocampo. (B) Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato ilustrando a marcação de FJ (indicada pela seta) 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução fisiológica (CTR e GR). (C) Imagem digital contendo ampliação de área destacada em (B) referente ao grupo STZ. CTR (n=5); GR (n= 5); STZ (n=5); STZ-GR (n= 5). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

Conforme ANOVA, em CA1 foi observado efeito significativo do fator Lesão STZ na geração de processo neurodegenerativo [$F(3,16) = 30,08$; $p < 0,001$], e ausência de efeito significativo para o fator Tratamento GR [$F(3,16) = 0,4121$; $p = 0,53$], indicando que o tratamento com GR não foi capaz de alterar os níveis de neurodegeneração causados pela injeção icv-STZ nesta região (Fig.47).

Figura 47 – (A) Quantificação de neurodegeneração (células FJ-positivas) na região CA1 do hipocampo. (B) Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato ilustrando a marcação de FJ (indicada pela seta) 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução fisiológica (CTR e GR). (C) Imagem digital contendo ampliação de área destacada em (B) referente ao grupo STZ. CTR (n=5); GR (n= 5); STZ (n=5); STZ-GR (n= 5). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

Conforme ANOVA, em CA3 foi observado efeito significativo do fator Lesão STZ na geração de processo neurodegenerativo [$F(3,16) = 26,41$; $p < 0,001$], e ausência de efeito significativo para o fator Tratamento GR [$F(3,16) = 0,0138$; $p = 0,908$], indicando que o tratamento com GR não foi capaz de alterar os níveis de neurodegeneração causados pela injeção icv-STZ nesta região (Fig.48).

Figura 48 – (A) Quantificação de neurodegeneração (células FJ-positivas) na região CA3 do hipocampo. (B) Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato ilustrando a marcação de FJ (indicada pela seta) 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução fisiológica (CTR e GR). (C) Imagem digital contendo ampliação de área destacada em (B) referente ao grupo STZ. CTR (n=5); GR (n= 5); STZ (n=5); STZ-GR (n= 5). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

Os resultados da avaliação de neurodegeneração estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação de Neurodegeneração.

REGIÃO ANATÔMICA	LESÃO STZ		TRAT. GR		INTERAÇÃO	
	F(3,16)	P	F(3,16)	P	F(3,16)	P
GIRO DENTADO	115,9	< 0,001	7,836	0,0129	7,836	0,0129
CA1	30,08	< 0,001	---	---	---	---
CA3	26,41	< 0,001	---	---	---	---

5.5 – Avaliação de geração de espécies reativas de oxigênio

Conforme ANOVA, foi observado no GD efeito significativo do fator Lesão STZ [F(3,15) = 8,904; p = 0,008] no aumento da quantidade de marcações e inexistência de efeito do fator Tratamento GR [F(3,15) = 0,3512; p = 0,5608]. Quando observada a intensidade óptica das marcações observa-se, conforme ANOVA, o efeito significativo do fator Lesão STZ [F(3,15) = 10,06; p = 0,0063] no aumento da intensidade óptica das marcações e uma tendência de efeito significativo do fator Tratamento GR [F(3,15) = 3,924; p = 0,0662] na redução da intensidade óptica das marcações, o que indica uma tendência de redução dos níveis de estresse oxidativo nesta região (Fig.49). A tendência do efeito do tratamento com GR na redução dos níveis de estresse oxidativo relacionados à intensidade óptica das marcações no GD também pode ser observada quando comparamos a diferença de percentual entre os grupos. Ao compararmos o grupo CTR com GR, observamos uma redução de 61,9 % da intensidade das marcações no grupo GR. Ao compararmos o grupo STZ com STZ-GR, observamos uma redução de 40% da intensidade das marcações no grupo STZ-GR.

Figura 49 – (A) Número de marcações de espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) no giro denteado do hipocampo. (B) Intensidade óptica das marcações das espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) no giro denteado do hipocampo. (C) Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a marcação de DHE 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução fisiológica (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra da marcação). CTR (n=4); GR (n= 4); STZ (n=5); STZ-GR (n= 6). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Dados expressos como média ± erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

Conforme ANOVA, foi observado no Hilus a inexistência de efeito significativo do fator Lesão STZ [$F(3,15) = 1,755$; $p = 0,201$] e inexistência de efeito do fator Tratamento GR [$F(3,15) = 1,162$; $p = 0,2945$] na alteração da quantidade de marcações. Quando observada a intensidade óptica das marcações observa-se, conforme ANOVA, o efeito significativo do fator Lesão STZ no aumento da intensidade óptica das marcações [$F(3,15) = 15,97$; $p = 0,001$] e existência de efeito significativo do fator Tratamento GR [$F(3,15) = 4,713$; $p = 0,046$], na redução da intensidade óptica das marcações o que indica a redução dos níveis de estresse oxidativo nesta região (Fig.50). Ao compararmos o grupo CTR com GR, observamos uma redução de 61,0% da intensidade das marcações no grupo GR. Ao compararmos o grupo STZ com STZ-GR, observamos uma redução de 33,4% da intensidade das marcações no grupo STZ-GR.

Figura 50 – (A) Número de marcações de espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) no hilus. (B) Intensidade óptica das marcações das espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) no hilus. (C) Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a marcação de DHE 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução fisiológica (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra da marcação). CTR (n=4); GR (n= 4); STZ (n=5); STZ-GR (n= 6). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

Conforme ANOVA, foi observado na região CA1 a inexistência de efeito significativo do fator Lesão STZ [$F(3,15) = 3,226$; $p = 0,092$] e inexistência de efeito do fator Tratamento GR [$F(3,15) = 0,8332$; $p = 0,375$] na alteração da quantidade de marcações. Quando observada a intensidade óptica das marcações observa-se, conforme ANOVA, a inexistência de efeito significativo do fator Lesão STZ [$F(3,15) = 3,7$; $p = 0,075$] e inexistência de efeito do fator Tratamento GR [$F(3,15) = 1,299$; $p = 0,2736$] na alteração da intensidade óptica das marcações (Fig.51).

Figura 51 – (A) Número de marcações de espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) na região CA1 do hipocampo. (B) Intensidade óptica das marcações das espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) na região CA1 do hipocampo. (C) Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a marcação de DHE 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução fisiológica (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra da marcação). CTR (n=4); GR (n=4); STZ (n=5); STZ-GR (n= 6). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

Conforme ANOVA, foi observado na região CA3 a inexistência de efeito significativo do fator Lesão STZ [$F(3,15) = 0,6827$; $p = 0,42$] e inexistência de efeito do fator Tratamento GR [$F(3,15) = 0,8288$; $p = 0,3753$] na alteração da quantidade de marcações. Quando observada a intensidade óptica das marcações observa-se, conforme ANOVA, a inexistência de efeito significativo do fator Lesão STZ [$F(3,15) = 0,2826$; $p = 0,601$] e inexistência de efeito do fator Tratamento GR [$F(3,15) = 0,2016$; $p = 0,659$] na alteração da intensidade óptica das marcações (Fig.52).

Figura 52 – (A) Número de marcações de espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) na região CA3 do hipocampo. (B) Intensidade óptica das marcações das espécies reativas de oxigênio (níveis de oxidação do DHE) na região CA3 do hipocampo. (C) Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a marcação de DHE 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução fisiológica (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra da marcação). CTR (n=4); GR (n=4); STZ (n=5); STZ-GR (n=6). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

Os resultados da avaliação de geração de espécies reativas de oxigênio estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio

QUANTIDADE DE MARCAÇÕES						
REGIÃO ANATÔMICA	LESÃO STZ		TRAT. GR		INTERAÇÃO	
	F(3,15)	P	F(3,15)	P	F(3,15)	P
GIRO DENTEADO	8,904	0,008	---	---	---	---
HILUS	---	---	---	---	---	---
CA1	---	---	---	---	---	---
CA3	---	---	---	---	---	---

INTENSIDADE ÓPTICA DAS MARCAÇÕES						
REGIÃO ANATÔMICA	LESÃO STZ		TRAT. GR		INTERAÇÃO	
	F(3,15)	P	F(3,15)	P	F(3,15)	P
GIRO DENTEADO	10,06	0,0063	---	---	---	---
HILUS	15,97	0,0012	4,713	0,0464	---	---
CA1	---	---	---	---	---	---
CA3	---	---	---	---	---	---

5.6 – Avaliação de neurogênese no giro denteado do hipocampo (Parte 1 - Proliferação e Diferenciação Celular)

Conforme ANOVA, o fator Lesão STZ apresentou efeito significativo na redução do número de células DCX-positivas no GD [$F(3,30) = 15,85$; $p < 0,001$] e o fator Tratamento GR apresentou efeito significativo no aumento da diferenciação de novos neurônios no GD [$F(3,30) = 5,703$; $p = 0,023$] (Fig.53).

Figura 53 – (A) Quantificação de proliferação e diferenciação neuronal (células DCX-positivas) no giro denteado do hipocampo. (B) Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a marcação de DCX 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução fisiológica (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra da marcação). (C) Imagem digital contendo ampliação de área destacada em (B) referente ao grupo GR. CTR (n=7); GR (n= 9); STZ (n=8); STZ-GR (n= 10). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

Os resultados da avaliação de diferenciação de novos neurônios estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Avaliação de Proliferação de Novos Neurônios

REGIÃO ANATÔMICA	LESÃO STZ		TRAT. GR		INTERAÇÃO	
	F(3,29)	P	F(3,29)	P	F(3,29)	P
GIRO DENTEADO	15,85	0,0004	5,703	0,0237	---	---

5.7 – Avaliação de neurogênese no giro denteado do hipocampo (Parte 2 – Sobrevivência Celular)

Conforme ANOVA, o fator Lesão STZ apresentou efeito significativo na redução do número de neurônios Brdu-positivos no GD [$F(3,8) = 14,95$; $p = 0,004$] e o fator Tratamento GR apresentou ausência de efeito significativo na taxa de sobrevivência dos novos neurônios no GD [$F(3,8) = 5,989$; $p = 0,413$] (Fig.54).

Figura 54 – (A) Quantificação de sobrevivência neuronal (células Brdu-positivas) no giro denteado do hipocampo. (B) Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a marcação de Brdu 21 dias após a injeção de Brdu (35 dias após a injeção icv). (C) Imagem digital contendo ampliação de área destacada em (B) referente ao grupo GR. CTR (n=3); GR (n= 3); STZ (n=3); STZ-GR (n= 3). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p<0,05$.

Os resultados da avaliação de sobrevivência de novos neurônios estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Avaliação de Sobrevivência de Novos Neurônios

REGIÃO ANATÔMICA	LESÃO STZ		TRAT. GR		INTERAÇÃO	
	F(3,8)	P	F(3,8)	P	F(3,8)	P
GIRO DENTEADO	14,95	0,0048	---	---	---	---

5.8 – Níveis de glicose no sangue periférico

Não foi observada diferença nos níveis glicêmicos entre os grupos. Conforme ANOVA, o fator Lesão STZ [$F(3,21) = 0,403$; $p = 0,532$] e o fator Tratamento GR [$F(3,21) = 2,03$; $p=0,168$] não apresentaram efeito significativo na diferenciação dos níveis glicêmicos dos animais (Fig.55).

Figura 55 - Efeitos da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina e do tratamento oral com geleia real sobre a glicemia de ratos. CTR (n=4); GR (n= 4); STZ (n=8); STZ-GR (n= 9). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p<0,05$.

5.9 – Peso Corporal

Conforme ANOVA foram observadas diferenças nas medidas de peso entre os grupos [$F(3,67) = 532,4$; $p < 0,001$] ao longo do período experimental [$F(3,67) = 75,29$; $p < 0,001$] (Fig.56). O pós-teste indica que os grupos que receberam injeção icv-STZ (grupos STZ e STZ-GR) apresentam redução de peso corporal com relação ao grupo CTR na medida do dia 14 (D14). Já os animais que morreram ao longo do período experimental apresentam notória redução de peso corporal na medida do dia 7 (D7).

Figura 56 - Efeitos da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina e do tratamento oral com geleia real sobre o peso corporal dos ratos. CTR (n=10); GR (n=13); STZ (n=11); STZ-GR (n= 15); STZ MORREU (n=11); STZ-GR MORREU (n=7). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pelo percentual do peso medido no dia da cirurgia icv (D0). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$.

5.10 – Taxa de Mortalidade

A figura 57 ilustra a sobrevivência dos animais pertencentes aos grupos CTR, GR, STZ e STZ-GR ao final do período de testes, 21 dias após a cirurgia de injeção icv-STZ. Nota-se que os animais que receberam injeção icv de solução fisiológica (grupos CTR e GR) apresentam taxa de sobrevivência de 100%. Observa-se conforme ANOVA que os animais que receberam injeção icv de estreptozotocina apresentaram redução da taxa de sobrevivência [$F(3,123) = 14,03$; $p < 0,001$]. Os animais do grupo STZ apresentaram 26% de taxa de mortalidade (taxa de sobrevivência 74%) e os animais do grupo STZ-GR apresentaram 21% de taxa de mortalidade (taxa de sobrevivência 79%).

Figura 57 - Efeitos da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina e do tratamento oral com geleia real sobre a glicemia de ratos. CTR (n=22); GR (n=25); STZ (n=42); STZ-GR (n=38). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pelo percentual de ratos vivos até o final do período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA de 2 vias) seguido do pós-teste de Bonferroni. * O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ em relação ao CTR.

6 - Discussão

Neste estudo mostramos as alterações comportamentais e histoquímicas induzidas pela injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (icv-STZ). O prejuízo no desempenho na memória operacional dos animais submetidos à injeção icv-STZ se evidenciou por todo o período de observação, do 4º ao 20º dia após injeção. Os estudos histoquímicos demonstraram uma neurodegeneração hipocampal, aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e uma redução da proliferação e sobrevivência de novos neurônios hipocampais. Em adição, demonstramos os efeitos benéficos do tratamento prolongado com a Geleia Real (GR), a qual foi capaz de atenuar os efeitos deletérios induzidos pela injeção icv-STZ, evidenciada em testes comportamentais, principalmente quando a tarefa do teste de memória operacional no Labirinto Aquático de Morris foi facilitada para um IET = zero. Os estudos moleculares também mostraram que o tratamento prolongado com a GR em animais injetados intraventricularmente com STZ produziu uma redução na extensão da neurodegeneração hipocampal e na geração de espécies reativas de oxigênio, além de um aumento da proliferação de novos neurônios. Assim, a GR mostrou efeitos benéficos para animais com prejuízo cognitivo, neurodegeneração e níveis altos de estresse oxidativo. Ainda, a ausência de alterações significantes na velocidade de natação dos animais dos grupos controle e icv-STZ é um indicativo consistente de que estes não apresentaram um déficit motor ou motivacional.

A doença de Alzheimer (AD) é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial, caracterizando-se como um dos grandes desafios da medicina e da neurociência. Com o objetivo de se compreender melhor os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da AD, diversos modelos in vivo e in vitro têm sido desenvolvidos (Saraceno et al., 2013). Apesar de existirem diversos modelos experimentais para a AD, nenhum deles ainda representa completamente o tipo SAD, o qual não têm relação direta com as alterações genéticas ou fatores hereditários identificados como fatores de risco para a doença (Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006). Referências indicam que a administração central de STZ em baixas doses não altera os níveis basais de glicose na corrente sanguínea e não produz diabetes mellitus, fato este também observado no presente estudo, mas causa deficiência na sinalização da insulina e resistência à insulina no cérebro, produzindo um decréscimo no metabolismo cerebral da glicose e energia, ocasionando consequentemente alterações comportamentais e moleculares relacionadas à SAD presente em humanos (De La Monte e Wands, 2008). Os animais submetidos ao modelo icv-STZ apresentam prejuízo cognitivo (Mayer *et al.*, 1990), disfunção colinérgica cerebral (Hellweg *et al.*, 1992), estresse oxidativo

(Sharma e Gupta, 2001) e alterações morfológicas como astrogliose e perda neuronal (Shoham *et al.*, 2003; Shoham *et al.*, 2007), além de aumento da expressão do peptídeo A β e hiperfosforilação da proteína tau, os quais são alterações características da AD (Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006; Salkovic-Petrisic *et al.*, 2013). Desta forma, o modelo da icv-STZ tem sido aceito por apresentar as principais características da AD, incluindo o prejuízo cognitivo e por isso tem sido utilizado para estudos patológicos e desenvolvimento de propostas terapêuticas para SAD.

Primeiramente em nosso trabalho validamos a equivalência de desempenho da memória espacial entre grupos experimentais no teste do Labirinto Aquático de Morris antes da lesão causada pelos procedimentos cirúrgicos, equivalência esta que também aparece no padrão de busca da plataforma no primeiro treino de cada sessão, quando nenhum dos grupos conhece a localização da plataforma. Com relação aos nossos resultados, demonstramos que a injeção icv-STZ foi capaz de causar um prejuízo no aprendizado e memória espacial operacional dos ratos. Este efeito deletério pode ser observado desde a primeira sessão, a qual foi realizada no 4º dia após a injeção icv-STZ e se prolongou por todo o período de observação, ou seja, até o 20º dia pós-cirurgia. Este prejuízo foi persistente na aquisição e manutenção da informação espacial em relação à localização da plataforma, o qual está representado pelo aumento de latência e percurso para encontrar a plataforma em cada uma das tentativas dentro de cada sessão. Verificamos também que os animais que receberam injeção icv-STZ apresentaram menor índice de melhora no desempenho da memória espacial no decorrer das 4 tentativas diárias do teste. Desta forma, identificamos que, assim como em estudos anteriores (Santos *et al.*, 2012; Zamani *et al.*, 2012), a injeção icv-STZ causou prejuízo de aprendizado e memória espacial em ratos avaliados no teste do labirinto aquático, o qual é característico de animais com lesão hipocampal, inclusive do giro denteado, como mostrado por (Xavier *et al.*, 1999).

Em nosso trabalho avaliamos o desempenho da memória espacial operacional. Para a avaliação da memória operacional no teste do Labirinto Aquático de Morris, a localização da plataforma é modificada a cada dia, permanecendo fixa nas tentativas de um mesmo dia. Como a localização da plataforma a cada dia é variada aleatoriamente, a informação sobre sua localização num dado dia é irrelevante para os dias subsequentes. Esse protocolo permite avaliar um tipo de memória temporária em que o animal deve, a cada dia, procurar pela plataforma em um local diferente em relação ao dia anterior. Este tipo de teste de memória está associado a um contexto temporal específico e válido para aquele dia e pode ser descartado após seu uso. Assim, os animais devem reter a informação sobre a localização da plataforma de modo a encontrá-la nas demais tentativas do dia.

Em nosso trabalho optamos por avaliar a memória operacional espacial devido ao conhecimento de que os prejuízos de memória operacional estão presentes nos estágios iniciais da doença de Alzheimer (Bird *et al.*, 2010). Um estudo dirigido para entender o cerne de processos cognitivos que suportam a desorientação topográfica apresentada por pacientes no estágio inicial de AD mostrou que estes pacientes são particularmente sensíveis a apresentarem um déficit na memória de curto prazo quando submetidos a um teste de memória espacial para a representação topográfica de uma paisagem (Bird *et al.*, 2010). Estes achados reforçam a relevância de se investigar a memória espacial operacional em modelos animais de AD. Neste sentido, Xavier e colaboradores mostraram a importância do uso do labirinto aquático de Morris para investigar este tipo de memória (Xavier *et al.*, 1999).

Além disso, como o tempo de Intervalo entre as Tentativas (IET) pode ser variado, é possível também avaliar no teste do Labirinto Aquático de Morris o tempo de retenção da memória operacional pela variação do tempo de IET (Olton, 1983; Santos, A.M.G, 1999). Referências indicam que o tempo de intervalo entre tentativas (IET) comumente empregados variam entre 10-15 segundos à 5-15 minutos (Vorhees e Williams, 2006). No que diz respeito à variação do Intervalo entre as Tentativas (IET), Santos e colaboradores (2012) demonstraram que a memória operacional dos ratos icv-STZ foi fortemente prejudicada quando o IET era igual a 10min, e que apesar destes animais não alcançarem o nível de desempenho equivalente aos animais do grupo controle, apresentaram uma melhora significativa de desempenho no teste quando IET foi igual à zero. Esse fato sugere que os animais lesionados apresentam algum tipo de aquisição de informação, enquanto seus mecanismos de retenção estão altamente comprometidos (Santos *et al.*, 2012). Assim, os ratos lesionados pela injeção icv-STZ podem manter a informação sobre a localização da plataforma por um curto período de tempo, mas após serem removidos da piscina, o tempo de espera até a próxima tentativa faz com que eles percam informação armazenada. Em nosso estudo, devido ao fato da performance dos animais dos grupos icv-STZ estar prejudicada, reduzimos o intervalo entre as tentativas das sessões de IET=15 min para IET=zero com o objetivo de avaliar o quanto esta redução poderia levar a uma melhora do desempenho dos animais lesionados em comparação com o observado quando o IET foi de 15 minutos.

Com a aplicação desta estratégia observamos que o desempenho dos animais do grupo STZ apresentou apenas uma redução da distância percorrida em relação à primeira tentativa ($T1 > T2 = T3 = T4$), mas sem alteração na latência e na % de tempo de permanência no quadrante crítico ou na % de tempo de permanência no contador. Por outro lado, observamos que a conjugação dos fatores de facilitação da tarefa produzida pela redução do

IET para zero com a administração prolongada de GR em animais icv-STZ (grupo STZ-GR) foi capaz de causar efeitos benéficos no desempenho da memória operacional, os quais são representados pela diminuição significativa da latência, da distância percorrida e aumento do tempo de permanência na área do contador ao longo das tentativas de cada sessão. Em adição, a redução do IET para zero mostrou que os animais do grupo STZ-GR apresentaram uma melhora gradual na performance de busca da plataforma que tende a se igualar à dos animais dos grupos controle (CTR e GR) ao longo das sessões (S7-S11), no que se refere aos parâmetros latência, distância e % de tempo de permanência no contador, enquanto, os animais do grupo STZ só apresentam uma pequena melhora na distância percorrida. Os dados mostram que a redução do IET de 15 min para zero os animais do grupo STZ-GR começam a apresentar uma diferença significativa no parâmetro latência a partir da sessão S7 (5 dias de tratamento com GR) a qual culmina na melhora destes animais que se igualam aos grupos não lesionados. Em relação a % de tempo de permanência no contador, esta melhora é evidente a partir do 10º dia da administração de GR, efeito este que não foi observado no protocolo onde utilizamos IET=15 (Fig.25). Já os animais dos grupos STZ apenas parecem lembrar de algumas dicas que estão fora da piscina as quais os guiam para uma direção aproximada onde a plataforma se localiza (Figs. 21 e 37). Estes resultados mostram que o prejuízo na memória operacional do grupo STZ foi levemente atenuado e apresentou uma pequena melhora de desempenho quando o intervalo entre tentativas é reduzido de 15 min para zero, mas que os animais lesionados pela injeção icv-STZ que receberam o tratamento prolongado com a GR (grupo STZ-GR) apresentaram uma melhora significativa de desempenho da memória operacional que se acentua gradualmente no decorrer do tratamento com a GR, indicando um efeito positivo do tratamento oral com GR.

Podemos dizer que ao longo dos dias de testes houve alguma melhora na performance dos animais lesionados, principalmente do grupo STZ-GR, indicando que estes adquiriram informações relevantes sobre a localização da plataforma, e tiveram uma ideia geral de onde ela se encontrava. Este padrão de resultados é típico de animais com lesão hipocampal e parece ser relacionado ao tipo de estratégia comportamental usada pelos animais para realizar a tarefa (Xavier et al, 1999). O uso de múltiplos pontos de partida durante o treino, como empregado em nosso trabalho, estimula o uso do mapa cognitivo. Ratos com lesão hipocampal perdem a habilidade para usarem mapas cognitivos, mas não as outras estratégias de navegação espacial (O'keefe et al., 1979). Assim, eles recorrem às outras estratégias que restaram, tais como estratégia de guiamento e orientação egocêntrica, as quais são menos precisas, para executar a tarefa.

Considerando nossos resultados e os resultados demonstrados por Santos e

colaboradores (2012), discutidos no parágrafo anterior referente à importância do intervalo de tempo entre as tentativas na avaliação do tempo de retenção da informação na memória operacional, podemos considerar que o protocolo em que utilizamos o tempo de intervalo entre as tentativas de 15 minutos, o qual conforme Vorhees e Williams (2006) é o limite máximo da faixa de tempo comumente empregado nos testes de memória espacial, tenha dificultado a manifestação de um efeito benéfico da administração oral da GR na melhora de desempenho da memória espacial operacional dos animais. Avaliando também os trabalhos anteriormente realizados, os quais haviam demonstrado que a administração oral de GR reduziu os prejuízos na memória espacial de referência em ratos submetidos ao modelo icv-STZ, identificamos que nestes trabalhos, os testes do Labirinto Aquático de Morris também foram realizados com a utilização de intervalos menores entre tentativas, sendo eles IET de 60s realizado por Pyrzanowska e colaboradores (2014) e IET igual à zero realizado por Zamani e colaboradores (2012). Nos estudos de Pyrzanowska e colaboradores (2014), os resultados indicam a melhora da memória de referência espacial no teste do Labirinto Aquático de Morris e o aumento da concentração dos neurotransmissores dopamina e serotonina no córtex pré-frontal do cérebro de ratos idosos, demonstrando uma perspectiva de uso profilático da GR durante o envelhecimento. Também foram encontrados efeitos positivos no estudo desenvolvido por Zamani e colaboradores (2012) ao demonstrarem que a GR reduz os prejuízos de aprendizagem e memória espacial em ratos submetidos ao modelo SAD via injeção icv-STZ. Nosso trabalho corrobora com estes estudos, ao demonstrarmos os efeitos positivos do tratamento oral com GR na melhora de desempenho da memória espacial operacional de ratos submetidos à injeção icv-STZ durante os testes do Labirinto Aquático de Morris realizados com tempo de Intervalo entre tentativas igual a zero (IET=0). Uma diferença metodológica significativa entre o nosso trabalho com os estudos realizados por Pyrzanowska e colaboradores (2014) e Zamani e colaboradores (2012) é que nos estudos realizados por estes pesquisadores foram avaliadas a capacidade de aprendizagem e memória de referência espacial dos animais. Nos testes de memória de referência, a plataforma é mantida no mesmo local da piscina ao longo de vários dias. Desta forma, o animal desenvolve uma memória sobre a localização da plataforma que é aplicável a vários dias diferentes, e a informação armazenada nos dias anteriores pode ser utilizada para melhorar o seu desempenho. Portanto, esta versão do teste está relacionada com a formação de uma memória de “longo prazo” ou memória de referência (Olton, 1983; Santos, A.M.G, 1999).

Em nosso trabalho avaliamos o desempenho da memória espacial operacional dos animais. Visto que o tratamento oral com GR proporcionou um efeito positivo na redução dos prejuízos causados pela injeção icv-STZ nos testes com IET=0, porém não sendo tais efeitos

observados nos testes com IET=15min, podemos dizer que GR atua trazendo benefícios para os mecanismos retenção da memória espacial operacional durante um certo período de tempo de armazenamento da informação. O tempo prolongado de intervalo entre as tentativas, como utilizado nos testes com IET=15min, faz com que a informação anteriormente retida pelos animais do grupo STZ-GR seja perdida e o desempenho da memória operacional nos testes seja equivalente aos animais lesionados não tratados com GR (grupo STZ).

Formulando então uma visão geral dos resultados de dados da literatura e de nosso trabalho sobre os efeitos do tratamento oral com geleia real em ratos submetidos ao modelo icv-STZ da doença de Alzheimer do tipo esporádica, temos que conforme indicado por referências anteriores, a GR reduz os prejuízos da memória espacial de referência (memória de longo prazo) e também proporciona um maior tempo de retenção da informação na memória operacional nos animais lesionados pela injeção icv-STZ.

Observamos também que no teste do Labirinto Aquático de Morris os animais submetidos ao modelo icv-STZ permaneceram mais tempo na borda da piscina, do que os animais dos grupos controle. A tendência de os animais permanecerem perto de superfícies verticais, a qual provavelmente tem por função protegê-los de predadores, é chamada de tigmotatismo (Grossen e Kelley, 1972; Treit e Fundytus, 1988). O tigmotatismo excessivo (especialmente em ratos) indica que o animal não está se concentrando na tarefa de forma adequada, porque uma das primeiras coisas que os animais têm que aprender no Labirinto Aquático de Morris é que não há como escapar pela borda da piscina. Tendo aprendido isto, a maioria dos animais nada se afastando da borda, buscando encontrar a plataforma. Não aprender esta abordagem básica indica que o animal pode não ter consciência adequada de seus arredores (Vorhees e Williams, 2006). Assim, com relação ao comportamento de tigmotatismo no teste de Labirinto Aquático de Morris, consideramos ser devido à desorientação espacial dos animais, associada à uma menor compreensão dos objetivos da tarefa. Trabalhos também associam o tigmotatismo à ansiedade e demonstram que drogas ansiolíticas podem suprimir o comportamento de tigmotatismo (Treit e Fundytus, 1988). Assim, a ansiedade talvez possa ter influência no processo de prejuízo de compreensão da tarefa e desorientação espacial dos animais durante o teste do labirinto aquático, promovendo o comportamento de tigmotatismo. No entanto, em nossos experimentos não observamos alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e comportamento exploratório durante o teste de Labirinto em Cruz Elevado, apesar de estudos anteriores terem demonstrado que animais que receberam injeção icv-STZ apresentam um comportamento ansiogênico no Labirinto em Cruz Elevado (Pinton et al., 2011) e um estado de agitação medida no Campo Aberto (Chen et al., 2013). Ainda, como já salientado, em nosso trabalho a ausência de

alteração na velocidade de natação dos animais também mostra que os animais não apresentavam déficit motor ou emocional.

O estudo de Santos e colaboradores (2012) demonstrou que o modelo icv-STZ apresenta neurodegeneração no hipocampo no período entre 1 e 15 dias após o procedimento cirúrgico de injeção icv-STZ, mas que não apresenta mais células FJ-positivas após 30 dias da injeção icv-STZ. Nosso trabalho corrobora com o de Santos e colaboradores, pois também identificamos no modelo icv-STZ a presença de neurodegeneração no giro denteado e áreas CA1 e CA3 do hipocampo, avaliados 21 dias após a injeção. Estudos associam lesões hipocâmpais à prejuízos na memória e orientação espacial, e mostram que células piramidais hipocâmpais exercem funções relacionadas à localização do animal no ambiente (Wilson e McNaughton, 1993). Diversos estudos demonstram que lesões hipocâmpais causam prejuízos de orientação espacial, e indicam que a integridade da formação hipocâmpal é necessária para a criação de um mapa cognitivo que suporte uma navegação espacial flexível e que se baseie em estratégia de referência do lugar (Xavier e Costa, 2009). Assim, em nosso estudo, poderíamos associar a morte neuronal na região hipocâmpal dos animais lesionados pela STZ com a redução do desempenho da memória espacial dos animais durante o teste do labirinto aquático. Em adição, nosso estudo mostrou pela primeira vez que a administração oral de GR por 14 dias consecutivos, iniciada 7 dias após o procedimento cirúrgico de injeção icv-STZ, reduz os níveis de degeneração neuronal no giro denteado do hipocampo, indicando um efeito neuroprotetor, o qual também foi evidenciado pela melhora de desempenho da memória espacial operacional destes animais no teste do Labirinto Aquático de Morris.

Um corpo crescente de evidências indica que a administração de icv-STZ gera espécies reativas de oxigênio, um tipo de radical livre, que resulta em aumento do estresse oxidativo (Shoham *et al.*, 2007). A estimativa do estresse oxidativo induzido por injeção icv-STZ comumente é medida em níveis de MDA (dialdeído malônico), um produto da peroxidação lipídica utilizada como indicador de geração de radicais livres, e níveis de GSH (glutathiona), um antioxidante endógeno sequestrador de radicais livres e protetor contra estresse oxidativo e produção de substâncias com radical nitróxido livre. Estes foram encontrados nos períodos de 1 e 8 semanas após uma única dose de 3mg/kg icv-STZ, sem envolvimento de óxido nítrico (Shoham *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, avaliamos o estresse oxidativo pelos níveis do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), representados pela marcação da oxidação do dihidroetídeo (DHE). A oxidação da DHE em produtos fluorescentes é utilizada para estimar os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares (Bindokas *et al.*, 1996; Liberman *et al.*, 2008). O DHE, forma reduzida do etídeo, entra livremente na célula e reage rapidamente com o $O_2^{\bullet-}$ formando o etídeo. Quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificação da

fluorescência vermelha. A oxidação do DHE é quantitativamente proporcional à concentração de $O_2^{\bullet-}$ na célula (Sharikabad *et al.*, 2001).

Identificamos em nossos estudos que os animais que receberam injeção icv-STZ (STZ e STZ-GR) apresentaram um maior índice de estresse oxidativo. Em nosso trabalho, ao observamos a quantidade e a intensidade óptica das marcações relacionadas aos níveis de estresse oxidativo no giro denteado, hilus, região CA1 e CA3 do hipocampo e, identificamos que os animais lesionados pela STZ apresentam um expressivo aumento da intensidade das marcações, no giro denteado e hilus, corroborando com a teoria do efeito oxidativo da injeção icv-STZ. Nossos resultados mostram que a injeção icv de estreptozotocina não causou aumento significativo na geração de espécies reativas de oxigênio nas regiões CA1 e CA3 hipocampais. Isto pode indicar que a injeção icv de STZ não alcançou estas regiões ou que estas não são sensíveis a este composto. Em relação à localização anatômica do GD e hilus podemos ver que estas regiões estão mais próximas do ventrículo lateral. Além disso, estas regiões apresentam uma circuitaria reverberante muito susceptível a efeitos deletérios (Amaral *et al.*, 2007; Christian *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo em roedores submetidos ao modelo icv-STZ tem sido amplamente relatado por vários grupos (Deshmukh *et al.*, 2009; Mehan *et al.*, 2011), e pesquisas apontam que o tratamento com antioxidantes pode aliviar o prejuízo cognitivo induzido por STZ e restaurar alterações bioquímicas no cérebro (Weinstock e Shoham, 2004; Ishrat, Hoda, *et al.*, 2009; Ishrat, Parveen, *et al.*, 2009; Isik *et al.*, 2009; Javed *et al.*, 2011; Saxena *et al.*, 2011; Dhull *et al.*, 2012; Javed *et al.*, 2012). Dentre as propriedades farmacológicas da GR, a capacidade eliminadora de radicais livres é uma das reconhecidas, indicando que a GR é um antioxidante bem eficaz (Pavel *et al.*, 2011). Os efeitos antioxidantes da GR foram demonstrados em diferentes órgãos e tipos celulares, incluindo a inibição da peroxidação lipídica, tanto in vitro quanto in vivo (El-Nekeety *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Zahmatkesh *et al.*, 2014). Observamos pela primeira vez em nosso presente trabalho que o tratamento oral prolongado com GR apresentou efeito antioxidante na região do hilus e tendência de efeito antioxidante na região do giro denteado do hipocampo pela redução do nível de intensidade das marcações relacionadas ao índice do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Ao analisarmos nossos resultados identificamos que no giro denteado do hipocampo, local onde identificamos o aumento expressivo do estresse oxidativo é também a região onde encontramos significativo índice de neurodegeneração causados pela injeção icv-STZ. Desta forma, podemos considerar que o estresse oxidativo causado pela injeção icv-STZ seja responsável, pelo menos em parte, por danos celulares e consequente neurodegeneração no giro denteado do

hipocampo, e que o efeito antioxidante da GR observada em nosso estudo, pode ter colaborado para a redução dos índices de morte neuronal nesta região.

Dada a importância da formação hipocampal para o bom funcionamento da memória espacial, e o que o giro denteado é a principal região de terminação da via perfurante proveniente do córtex entorrinal, o qual é fonte de grande parte das informações sensoriais corticais que a formação hipocampal utiliza para desempenhar suas funções, é razoável considerar que o giro de denteado atue no primeiro estágio do processamento das informações que levam a produção de memórias (Amaral *et al.*, 2007). Neste circuito a informação oriunda do córtex entorrinal flui pela via perfurante até as células granulares do GD, as quais através das fibras musgosas transmitem a informação para as células piramidais da região CA3 do hipocampo. Em seguida a informação é transmitida para as células piramidais da região CA1 através da via colateral de Schaffer, e finalmente vai para o subículo, chegando novamente ao córtex entorrinal. Este circuito hipocampal primário, forma um circuito em loop, no qual a informação sensorial oriunda de áreas corticais específicas que convergem no córtex entorrinal, sendo então processada pela circuitaria hipocampal, e retorna para a região de origem no córtex entorrinal, e desta para as outras regiões corticais relacionadas com a formação de memórias. É importante ressaltar também que o processamento da informação pelo circuito hipocampal também é influenciado pelas projeções diretas provenientes do córtex entorrinal para regiões CA3 e CA1, em conjunto com as múltiplas aferências modulatórias oriundas de outras regiões cerebrais para o hipocampo (Christian *et al.*, 2014). Além disso, a neuroanatomia única do giro dentado prevê que ele realiza uma tarefa específica de processamento de informação com as informações que recebe do córtex entorrinal e, finalmente, transmite à região CA3 do hipocampo (Amaral *et al.*, 2007; Christian *et al.*, 2014). Com relação à região hilar, na qual observamos em nosso trabalho a ocorrência dos efeitos de neurodegeneração causados pela STZ e os efeitos neuroprotetores proporcionados pelo tratamento oral com GR, os estudos indicam a existência de uma importante circuitaria modulatória, a qual tem significativa influência no processamento da memória no GD. O GD possui diversos neurônios inibitórios GABAérgicos dentro do hilus e na camada molecular e, além disso, a camada polimórfica possui em grande variedade de tipos celulares (Amaral *et al.*, 2007). As principais células do hilus são as células musgosas glutamatérgicas, as quais recebem aferências das células granulares via fibras musgosas, e então inervam interneurônios locais, além de emitirem projeções de feedback para as células granulares (Amaral *et al.*, 2007; Christian *et al.*, 2014). Desta forma, consideramos que o efeito neuroprotetor proporcionado pelo tratamento oral com GR observado na região do giro denteado durante as análises de estresse oxidativo e neurodegeneração seja responsável

pela preservação da circuitaria hipocampal, em especial no giro denteado, e desta forma, colabore com a manutenção e/ou recuperação parcial dos mecanismos de processamento de informações destinadas à formação de memórias; preservação esta observada tanto na memória operacional, demonstrada em nosso presente trabalho, como também demonstrada anteriormente por outros pesquisadores na memória de referência (Zamani *et al.*, 2012).

Os conhecimentos atuais sobre a neurogênese hipocampal adulta indicam que a produção de novos neurônios no cérebro segue um processo de vários passos, no qual as células recém nascidas são submetidas à vários fatores que influenciam a proliferação, a maturação, a determinação do destino e a sobrevivência celular (Brüel-Jungferman *et al.*, 2007). Diversos estudos foram realizados para entender o papel da neurogênese no funcionamento hipocampal (Deng *et al.*, 2010; Aimone e Gage, 2011; Lazarini e Lledo, 2011; Sahay *et al.*, 2011). De um modo geral, em termos comportamentais, várias condições que diminuem a neurogênese no giro denteado em roedores são associadas com déficits de aprendizado. Estas condições incluem estresse, aumento dos níveis de glicocorticóides, e envelhecimento (Montaron *et al.*, 2006; Drapeau *et al.*, 2007). Da mesma forma, condições que aumentam a neurogênese, como enriquecimento ambiental e atividade física, tendem a aumentar o desempenho de tarefas dependentes do hipocampo (Kempermann *et al.*, 1997; Van Praag *et al.*, 1999; Van Praag *et al.*, 2005). No entanto, devido complexa relação de fatores que regulam a neurogênese adulta, uma possível correlação entre o número de novos neurônios gerados e o desempenho de aprendizado não deve ser entendida necessariamente numa relação de causa e efeito. Estudos ainda apresentam controvérsias com relação à influência da neurogênese nos processos de aprendizado e memória (Leuner *et al.*, 2007) e também da influência das experiências de aprendizado e memória na regulação dos processos de neurogênese (Epp *et al.*, 2011; Epp *et al.*, 2013). No entanto, uma grande variedade de abordagens metodológicas dentre os diversos estudos pode ser uma possível explicação para os diferentes resultados, indicando que ainda são necessários avanços na área para se compreender a relevância funcional da neurogênese adulta.

Nos últimos anos, no entanto, registraram-se progressos significativos que contribuíram para um maior entendimento da neurogênese adulta nas funções cerebrais. Estudos recentes propõem que a neurogênese adulta não deve ser caracterizada como um processo de reposição celular, mas sim como um mecanismo que mantém a plasticidade do circuito hipocampal pela adição contínua de neurônios imaturos e novos neurônios dotados de propriedades únicas, além da plasticidade estrutural promovida pela integração destes novos neurônios na circuitaria existente. Assim, a neurogênese hipocampal adulta tem despertado interesse significativo devido ao seu potencial de influenciar o processamento da informação

no lobo temporal medial, o qual é um substrato neural para muitas formas de aprendizagem e memória, além de um local associado fisiopatologicamente a vários distúrbios neurológicos (Christian *et al.*, 2014).

O método de marcação da doublecortina (DCX) permite quantificar a existência de neurônios imaturos, ou seja, neuroblastos que ainda não se integraram à circuitaria neuronal. Referências indicam que além de causar morte neuronal em diversas regiões cerebrais, incluindo córtex, hipocampo, septo e corpo caloso (Kraska *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014), a STZ administrada intraperitonealmente reduz a neurogênese adulta diminuindo a taxa de proliferação, maturação e sobrevivência de células no giro denteado do hipocampo (GD) em modelos de ratos diabéticos (Jackson-Guilford *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008). Um trabalho recente de (Sun *et al.*, 2015) mostrou também que a injeção icv de STZ causa redução na geração de novos neurônios na região septal hipocampo após 3 meses da injeção icv-STZ, porém neste estudo a redução da neurogênese não havia sido observada após 1 mês da injeção icv-STZ. Em contrapartida, estudos realizados por (Qu *et al.*, 2012) identificaram a redução de proliferação células progenitoras e da diferenciação de novos neurônios na região do giro denteado do hipocampo de ratos 21 dias após a injeção icv-STZ. Nosso estudo também mostra que a injeção icv de STZ é capaz de reduzir a neurogênese, onde quantificamos o nível de neurônios imaturos (número de células DCX-positivas) na região do giro denteado do hipocampo 21 dias após a lesão induzida pela STZ. Verificamos na literatura que assim como ocorre uma controvérsia a respeito da relação de influência entre a neurogênese e os processos aprendizado e memória (Leuner *et al.*, 2007), ocorre também uma controvérsia a respeito da influência da neurogênese na patologia da AD (Boekhoorn *et al.*, 2006; Herring *et al.*, 2009), reforçando assim a necessidade de realização de mais estudos para se compreender a relevância funcional da neurogênese adulta e o seu papel na patologia da AD.

Estudos anteriores já haviam identificado que componentes da GR foram capazes de facilitar a neurogênese em ensaios *in vitro* (Hattori *et al.*, 2007b). Ao avaliarmos o efeito da administração oral prolongada da geleia diferenciação de novos neurônios *in vivo*, verificamos pela primeira vez que a GR foi capaz de elevar o nível de proliferação de novos neurônios granulares no giro denteado do hipocampo dos animais. Quando analisamos a sobrevivência dos novos neurônios granulares do giro denteado do hipocampo verificamos que a injeção icv-STZ reduziu significativamente o número de neurônios Brdu-positivos mas que o tratamento oral com GR não apresentou alterações na quantidade de novos neurônios maduros integrados à camada de células granulares. Com base em nossos resultados, podemos associar que a redução da neurogênese causada pela injeção icv-STZ e pelo aumento da

proliferação de neurônios no GD causado pelo tratamento oral com GR estão relacionados respectivamente com os prejuízos de memória dos animais do grupo STZ e a melhora de desempenho da memória dos animais do grupo STZ-GR. No entanto, devido à complexidade do processo de neurogênese associada às controvérsias nos resultados de estudos anteriores a respeito da influência da neurogênese nos processos de aprendizado e memória não é possível afirmarmos que a redução da neurogênese causada pela injeção icv-STZ e o aumento da proliferação neuronal causados pelo tratamento oral com GR tenham sido os principais responsáveis pelas diferenças no desempenho de memória entre os grupos. Porém, de certa maneira, nossos dados mostram que é possível considerarmos que as variações relacionadas à neurogênese exercem algum tipo influência sobre o desempenho do aprendizado e da memória. Além disso, um número crescente de estudos vem demonstrando que a disfunção da neurogênese do hipocampo adulto pode desempenhar um papel causal em diversos distúrbios cerebrais (Parent, 2003; Sahay e Hen, 2007; Kempermann *et al.*, 2008; Winner *et al.*, 2011). Desta forma, compreendemos a função fisiológica da neurogênese adulta não só fornece uma nova perspectiva sobre a plasticidade do sistema nervoso maduro, mas também tem implicações significativas para o entendimento de várias doenças cerebrais e evolução da medicina regenerativa. Por conseguinte, os estudos sobre a neurogênese adulta podem vir a promover o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em potencial para os distúrbios do cérebro. Além disso, os princípios básicos aprendidos com o desenvolvimento neuronal e integração sináptica dos neurônios recém-nascidos no processo de neurogênese, poderá fornecer também valiosas informações para o desenvolvimento futuro da terapia de reposição celular no sistema nervoso.

Assim, o aumento da proliferação de novos neurônios proporcionados pelo tratamento oral com GR pode também ser considerado como um resultado de significativo valor neuroprotetor, um vez que estudos indicam que os neurônios recém-gerados, ainda imaturos, exercem grande influência na dinâmica da circuitaria hipocampal, além de causar impacto em aspectos cognitivos e comportamentais relacionados ao aprendizado e memória, reconhecimento de padrões, estresse e transtornos de humor (Christian *et al.*, 2014). As propriedades eletrofisiológicas dos neurônios recém-formados são bem diferentes dos neurônios já existentes. No processo de maturação os neurônios recém-nascidos exibem respostas tônicas ao neurotransmissor gama-aminobutírico (GABA) liberado por interneurônios locais, e gradualmente passam a ser hiperpolarizantes (Overstreet Wadiche *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006). Posteriormente, com o avançar do processo de maturação, por volta de 11 a 14 dias após o nascimento dos neurônios recém-gerados, formam-se sinapses as glutamatérgicas na região do hilus e CA3, adquirindo desta forma a capacidade de

participar do mesmo circuito hipocampal tal qual os neurônios maduros pré-existentes (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006; Overstreet-Wadiche et al., 2006). Apesar dos avanços obtidos na área, ainda é necessário um conhecimento mais profundo sobre as eferências dos novos neurônios em processo de maturação para alcançarmos um maior entendimento a respeito das funções da neurogênese (Christian et al., 2014). Em comparação às células granulares maduras, os novos neurônios exibem hiperexcitabilidade e aumento da plasticidade sináptica em suas aferências glutamatérgicas durante o período crítico de maturação. Assim, os neurônios recentemente integrados na camada granular contribuem diretamente com as funções hipocampais tanto como unidade de processamento de informação, e também como um circuito modulador ativo da circuitaria local (Christian et al., 2014). Neste sentido, a recuperação dos níveis de proliferação de novos neurônios no GD parece ser importante para a manutenção das funções hipocampais. Consideramos desta forma que o efeito neuroprotetor identificado pelo aumento do número de proliferação dos novos neurônios no GD do hipocampo, proporcionado pelo tratamento oral com GR, tem sua parcela de importância na recuperação do desempenho da memória, atuando conjuntamente com os demais efeitos neuroprotetores de redução dos níveis de estresse oxidativo e redução da neurodegeneração observados em nossos estudos.

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho demonstram que o tratamento prolongado com a Geleia Real reduziu os efeitos deletérios na cognição, neurodegeneração e estresse oxidativo em animais submetidos ao modelo de injeção icv-STZ da doença de Alzheimer esporádica. Assim, a GR apresenta ter um potencial valor terapêutico para o tratamento de déficits cognitivos e uma ação benéfica em processos neurodegenerativos.

7 - Conclusão

- A injeção icv-STZ em ratos induz prejuízos de memória espacial operacional observados no teste de labirinto aquático de Morris. O tratamento oral com GR foi capaz de reduzir os prejuízos de memória causados pela injeção icv-STZ, ampliando o tempo de retenção da memória operacional dos animais.
- A administração icv de STZ induziu a morte neuronal hipocampal e o tratamento prolongado com geleia real protegeu parcialmente os animais da neurodegeneração induzida pela STZ.
- A administração icv de STZ aumentou o nível de estresse oxidativo no giro denteado do hipocampo e no hilus, sendo que o tratamento prolongado com geleia real apresentou efeito antioxidante no hilus e tendência de efeito antioxidante no giro denteado do hipocampo.
- A administração icv de STZ reduziu a neurogênese hipocampal e a geleia real aumentou a proliferação de novos neurônios na mesma região.

8 - Referências Bibliográficas

- ABERG, M. A. et al. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 20, n. 8, p. 2896-903, Apr 2000. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751442> >.
- ABROUS, D. N.; KOEHL, M.; LE MOAL, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. **Physiol Rev**, v. 85, n. 2, p. 523-69, Apr 2005. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333.
- AGRANOFF, B. W. **Learning and Memory. In: Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.** 6th. Lippincott-Raven Publishers, 1998.
- AGRAWAL, R. et al. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 4, p. 779-87, Mar 2009. ISSN 0028-3908.
- AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. Modeling new neuron function: a history of using computational neuroscience to study adult neurogenesis. **Eur J Neurosci**, v. 33, n. 6, p. 1160-9, Mar 2011. ISSN 1460-9568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395860> >.
- AIMONE, J. B. et al. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. **Physiol Rev**, v. 94, n. 4, p. 991-1026, Oct 2014. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287858> >.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; HERRERA, D. G.; WICHTERLE, H. The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. **Prog Brain Res**, v. 127, p. 1-11, 2000. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11142024> >.
- ALZHEIMER, A. et al. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". **Clin Anat**, v. 8, n. 6, p. 429-31, 1995. ISSN 0897-3806 (Print) 0897-3806.
- AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Prog Brain Res**, v. 163, p. 3-22, 2007. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765709> >.
- AMBROGINI, P. et al. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. **Brain Res**, v. 1017, n. 1-2, p. 21-31, Aug 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15261095> >.
- AMIRSHAHI, T.; NAJAFI, G.; NEJATI, V. Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin-induced male rats. **Iran J Reprod Med**, v. 12, n. 3, p. 209-16, Mar 2014. ISSN 1680-6433 (Print) 1680-6433.
- AZIZI, S. A.; VENDRAME, M. Exercise: a workout for neuroregeneration. **Neurosci Lett**, v. 418, n. 3, p. 211-2, May 2007. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17466455> >.
- BADDELEY, A. EYSENCK, M. A., M. **Memória.** Porto Alegre: Artmed, 2011.
- BADDELEY, A. **Human Memory, Theory and Practice Human Memory, Theory and Practice.** Boston: Allyn & Bacon, 1997.
- BEUZEN, A.; BELZUNG, C. Link between emotional memory and anxiety states: a study by principal component analysis. **Physiol Behav**, v. 58, n. 1, p. 111-8, Jul 1995. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7667407> >.
- BIESSELS, G. J.; KAPPELLE, L. J.; GROUP, U. D. E. S. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? **Biochem Soc Trans**, v. 33, n. Pt 5, p. 1041-4, Nov 2005. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16246041> >.

BINDOKAS, V. P. et al. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. **J Neurosci**, v. 16, n. 4, p. 1324-36, Feb 1996. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8778284> >.

BIRD, C. M. et al. Topographical short-term memory differentiates Alzheimer's disease from frontotemporal lobar degeneration. **Hippocampus**, v. 20, n. 10, p. 1154-69, Oct 2010. ISSN 1098-1063. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19852032> >.

BLACKSTAD, T. W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. **J Comp Neurol**, v. 105, n. 3, p. 417-537, Oct 1956. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13385382> >.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol**, v. 39, p. 43-68, 1988. ISSN 0066-4308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2894198> >.

BLESA, R. Noncognitive symptoms and long-term treatment expectations for Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 18 Suppl 1, p. S9-16, Apr-Jun 2004. ISSN 0893-0341 (Print) 0893-0341.

BLOKLAND, A.; JOLLES, J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44, n. 2, p. 491-4, Feb 1993. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446683> >.

BLONDEL, O.; PORTHA, B. Early appearance of in vivo insulin resistance in adult streptozotocin-injected rats. **Diabete Metab**, v. 15, n. 6, p. 382-7, Nov-Dec 1989. ISSN 0338-1684 (Print) 0338-1684.

BOEKHOORN, K.; JOELS, M.; LUCASSEN, P. J. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. **Neurobiol Dis**, v. 24, n. 1, p. 1-14, Oct 2006. ISSN 0969-9961 (Print) 0969-9961.

BOGDANOV, S. Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. **Lipids**, v. 3, n. 8, p. 8-19, 2014.

BREITNER, J. C. et al. Risk of dementia and AD with prior exposure to NSAIDs in an elderly community-based cohort. **Neurology**, v. 72, n. 22, p. 1899-905, Jun 2 2009. ISSN 0028-3878.

BRODY, H. Alzheimer's disease. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. S1, Jul 14 2011. ISSN 0028-0836.

BROWN, T. H.; ZADOR, A. M. **The Synaptic Organization of the Brain**. Hippocampus, 1990.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; RAMPON, C.; LAROCHE, S. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. **Rev Neurosci**, v. 18, n. 2, p. 93-114, 2007. ISSN 0334-1763 (Print) 0334-1763.

BRÄNNVALL, K. et al. 19-Nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain. **Eur J Neurosci**, v. 21, n. 4, p. 871-8, Feb 2005. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15787693> >.

BUTTERFIELD, D. A.; DI DOMENICO, F.; BARONE, E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 9, p. 1693-706, Sep 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24949886> >.

BÁTIZ, L. F. et al. Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 501, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26834560> >.

BĂRNUȚIU, L. I. E. A. **Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Royal Jelly - Review**: Animal Science and Biotechnologies 2011.

CAMERON, H. A.; GOULD, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 61, n. 2, p. 203-9, Jul 1994. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969902> >.

- CANDEIAS, E. et al. The impairment of insulin signaling in Alzheimer's disease. **IUBMB Life**, v. 64, n. 12, p. 951-7, Dec 2012. ISSN 1521-6543.
- CASAS, C. et al. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. **Am J Pathol**, v. 165, n. 4, p. 1289-300, Oct 2004. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466394> >.
- CEREJEIRA, J.; LAGARTO, L.; MUKAETOVA-LADINSKA, E. B. Behavioral and psychological symptoms of dementia. **Front Neurol**, v. 3, p. 73, 2012. ISSN 1664-2295.
- CHEN, C. et al. Contribution of neural cell death to depressive phenotypes of streptozotocin-induced diabetic mice. **Dis Model Mech**, v. 7, n. 6, p. 723-30, Jun 2014. ISSN 1754-8403.
- CHEN, Y. et al. A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). **Mol Neurobiol**, v. 47, n. 2, p. 711-25, Apr 2013. ISSN 0893-7648.
- _____. Brain gene expression of a sporadic (icv-STZ Mouse) and a familial mouse model (3xTg-AD mouse) of Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51432, 2012. ISSN 1932-6203.
- CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. L. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. **Annu Rev Neurosci**, v. 37, p. 243-62, 2014. ISSN 1545-4126. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905596> >.
- CITRON, M. Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1055-7, Nov 2002. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256.
- CORRADA, M. M. et al. Prevalence of dementia after age 90: results from the 90+ study. **Neurology**, v. 71, n. 5, p. 337-43, Jul 29 2008. ISSN 0028-3878.
- CORREIA, S. C. et al. Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic Alzheimer's disease? **Ageing Res Rev**, v. 10, n. 2, p. 264-73, Apr 2011. ISSN 1568-1637.
- DAUNCEY, M. J. Genomic and epigenomic insights into nutrition and brain disorders. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 887-914, Mar 2013. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23503168> >.
- DAYER, A. G. et al. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. **J Comp Neurol**, v. 460, n. 4, p. 563-72, Jun 2003. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717714> >.
- DE LA MONTE, S. M. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer's disease: mini-review. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, n. 12, p. 1954-60, Dec 2014. ISSN 1873-7862. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25088942> >.
- DE LA MONTE, S. M. et al. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 10, n. 1, p. 89-109, Sep 2006. ISSN 1387-2877. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988486> >.
- DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **J Diabetes Sci Technol**, v. 2, n. 6, p. 1101-13, Nov 2008. ISSN 1932-2968.
- DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 5, p. 339-50, May 2010. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354534> >.
- DESHMUKH, R. et al. Amelioration of intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive dysfunction and oxidative stress by vinpocetine -- a PDE1 inhibitor. **Eur J Pharmacol**, v. 620, n. 1-3, p. 49-56, Oct 12 2009. ISSN 0014-2999.

- DHULL, D. K. et al. Neuroprotective effect of cyclooxygenase inhibitors in ICV-STZ induced sporadic Alzheimer's disease in rats. **J Mol Neurosci**, v. 46, n. 1, p. 223-35, Jan 2012. ISSN 0895-8696.
- DIEAMANT, G.C. Avaliação dos efeitos imuno-hematopoiéticos da Geleia Real em modelo experimental de listeriose murina. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, SP. 2003.
- DINIZ, L. et al. Effects of chronic treatment with corticosterone and imipramine on fos immunoreactivity and adult hippocampal neurogenesis. **Behav Brain Res**, v. 238, p. 170-7, Feb 2013. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23098799> >.
- DRAPEAU, E. et al. Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. **J Neurosci**, v. 27, n. 22, p. 6037-44, May 2007. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537975> >.
- DUAN, X. et al. Development of neural stem cell in the adult brain. **Curr Opin Neurobiol**, v. 18, n. 1, p. 108-15, Feb 2008. ISSN 0959-4388. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514504> >.
- DUELLI, R. et al. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 12, n. 8, p. 737-43, Dec 1994. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7747600> >.
- EL-NEKEETY, A. A. et al. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. **Toxicol**, v. 50, n. 2, p. 256-69, Aug 2007. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101.
- ENCINAS, J. M.; SIERRA, A. Neural stem cell deforestation as the main force driving the age-related decline in adult hippocampal neurogenesis. **Behav Brain Res**, v. 227, n. 2, p. 433-9, Feb 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019362> >.
- EPP, J. R.; CHOW, C.; GALEA, L. A. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. **Front Neurosci**, v. 7, p. 57, 2013. ISSN 1662-4548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596385> >.
- EPP, J. R.; HAACK, A. K.; GALEA, L. A. Activation and survival of immature neurons in the dentate gyrus with spatial memory is dependent on time of exposure to spatial learning and age of cells at examination. **Neurobiol Learn Mem**, v. 95, n. 3, p. 316-25, Mar 2011. ISSN 1095-9564. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216298> >.
- ESPÓSITO, M. S. et al. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. **J Neurosci**, v. 25, n. 44, p. 10074-86, Nov 2005. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267214> >.
- EYSENCK, M. K. M. **Manual de Psicologia Cognitiva**. Sed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- FELDMAN, H. **Atlas of Alzheimer's Disease**. London: CRC Press, 2007.
- FERNANDEZ, J. A. et al. The damage signals hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis. **J Alzheimers Dis**, v. 14, n. 3, p. 329-33, Jul 2008. ISSN 1387-2877 (Print) 1387-2877.
- FROLICH, L. et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. **J Neural Transm**, v. 105, n. 4-5, p. 423-38, 1998. ISSN 0300-9564 (Print) 0300-9564.
- GABOR MIKLOS, G. L.; MALESZKA, R. Epigenomic communication systems in humans and honey bees: from molecules to behavior. **Horm Behav**, v. 59, n. 3, p. 399-406, Mar 2011. ISSN 1095-6867. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594964> >.
- GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult brain. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 612-3, Feb 2002. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826087> >.

GALEANO, P. et al. Longitudinal analysis of the behavioral phenotype in a novel transgenic rat model of early stages of Alzheimer's disease. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 321, 2014. ISSN 1662-5153.

GARCIA, R. C. T. **Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo: Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) 2009.

GE, S. et al. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. **Nature**, v. 439, n. 7076, p. 589-93, Feb 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341203> >.

GIRARDI, A. C. et al. Upregulation of NHE3 is associated with compensatory cell growth response in young uninephrectomized rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 283, n. 6, p. F1296-303, Dec 2002. ISSN 1931-857X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388404> >.

GOULD, E. et al. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 2492-8, Apr 1997. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9065509> >.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 1, p. 67-70, 1993. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879x.

GROSSEN, N. E.; KELLEY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **J Comp Physiol Psychol**, v. 81, n. 2, p. 307-10, Nov 1972. ISSN 0021-9940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5084446> >.

GRUNBLATT, E. et al. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. **J Neurochem**, v. 101, n. 3, p. 757-70, May 2007. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042.

GUO, H. et al. Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 54, n. 3, p. 191-5, Jun 2008. ISSN 0301-4800 (Print) 0301-4800.

HAASS, C.; KAHLE, P. J. Parkinson's pathology in a fly. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 341, 343, Mar 23 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

HARMAN, D. Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1067, p. 454-60, May 2006. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923.

HASHIMOTO, M. et al. Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 69, n. 4, p. 800-5, Apr 2005. ISSN 0916-8451. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849420> >.

HATTORI, N. et al. AMP N1-oxide potentiates astrogenesis by cultured neural stem/progenitor cells through STAT3 activation. **Biomed Res**, v. 28, n. 6, p. 295-9, Dec 2007a. ISSN 0388-6107.

_____. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. **Biomed Res**, v. 28, n. 5, p. 261-6, Oct 2007b. ISSN 0388-6107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000339> >.

_____. Identification of AMP N1-oxide in royal jelly as a component neurotrophic toward cultured rat pheochromocytoma PC12 cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 70, n. 4, p. 897-906, Apr 2006. ISSN 0916-8451 (Print) 0916-8451.

_____. Royal jelly facilitates restoration of the cognitive ability in trimethyltin-intoxicated mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 165968, 2011. ISSN 1741-4288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19376837> >.

HELENE, A.; XAVIER, G. Memória e (Elaboração da) percepção, imaginação inconsciente e consciência. In: LADEIRA-FERNANDEZ, J. E. S., M. T. A. (Ed.). **Intersecções entre psicologia e neurociências**. Rio de Janeiro: MedBook, 2007.

HELLWEG, R. et al. Nerve growth factor and choline acetyltransferase activity levels in the rat brain following experimental impairment of cerebral glucose and energy metabolism. **J Neurosci Res**, v. 31, n. 3, p. 479-86, Mar 1992. ISSN 0360-4012 (Print) 0360-4012.

HELMES, E.; OSTBYE, T. Beyond memory impairment: cognitive changes in Alzheimer's disease. **Arch Clin Neuropsychol**, v. 17, n. 2, p. 179-93, Feb 2002. ISSN 0887-6177 (Print) 0887-6177.

HERB, B. R. et al. Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 1371-3, Oct 2012. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983211> >.

HERNANDES, M. S. et al. Reactive oxygen species and the structural remodeling of the visual system after ocular enucleation. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1249-60, Nov 2010. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20728508> >.

HERRING, A. et al. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. **Exp Neurol**, v. 216, n. 1, p. 184-92, Mar 2009. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19118549> >.

HONDA, Y. et al. Lifespan-extending effects of royal jelly and its related substances on the nematode *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23527, 2011. ISSN 1932-6203.

HOYER, S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 105, n. 4-5, p. 415-22, 1998. ISSN 0300-9564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9720971> >.

_____. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. **Adv Exp Med Biol**, v. 541, p. 135-52, 2004. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598.

HOYER, S.; RIEDERER, P. Alzheimer disease--no target for statin treatment. A mini review. **Neurochem Res**, v. 32, n. 4-5, p. 695-706, Apr-May 2007. ISSN 0364-3190 (Print) 0364-3190.

HYMAN, B. T.; VAN HOESEN, G. W.; DAMASIO, A. R. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. **Neurology**, v. 40, n. 11, p. 1721-30, Nov 1990. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2234428> >.

ISHRAT, T. et al. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 9, p. 636-47, Sep 2009. ISSN 0924-977x.

_____. Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Brain Res**, v. 1281, p. 117-27, Jul 24 2009. ISSN 0006-8993.

ISIK, A. T. et al. Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model. **Age (Dordr)**, v. 31, n. 1, p. 39-49, Mar 2009.

ITO, S. et al. Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-trans-2-decenoic Acid, a unique unsaturated Fatty Acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 139140, 2012. ISSN 1741-427x.

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Behav Neural Biol**, v. 51, n. 2, p. 171-202, Mar 1989. ISSN 0163-1047. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2564771> >.

_____. **Memória**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I. et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behav Pharmacol**, v. 9, n. 5-6, p. 421-7, Sep 1998. ISSN 0955-8810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832927> >.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997. ISSN 1074-7427. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398590> >.

IZQUIERDO, L. A. et al. Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. **Behav Brain Res**, v. 111, n. 1-2, p. 93-8, Jun 2000. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840135> >.

JACKSON-GUILFORD, J.; LEANDER, J. D.; NISENBAUM, L. K. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus. **Neurosci Lett**, v. 293, n. 2, p. 91-4, Oct 27 2000. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940.

JAVED, H. et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. **Neuroscience**, v. 210, p. 340-52, May 17 2012. ISSN 0306-4522.

_____. S-allyl cysteine attenuates oxidative stress associated cognitive impairment and neurodegeneration in mouse model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Brain Res**, v. 1389, p. 133-42, May 10 2011. ISSN 0006-8993.

JIN, K. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 18, p. 11946-50, Sep 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181492> >.

KANBUR, M. et al. Effects of sodium fluoride exposure on some biochemical parameters in mice: evaluation of the ameliorative effect of royal jelly applications on these parameters. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 6, p. 1184-9, Jun 2009. ISSN 0278-6915.

KANDEL, E. R. et al. **Principles of Neural Science**. McGraw-Hill Professional, 2012. 1760.

KEMPERMANN, G. Neuronal stem cells and adult neurogenesis. **Ernst Schering Res Found Workshop**, n. 35, p. 17-28, 2002. ISSN 0947-6075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11816271> >.

KEMPERMANN, G.; KREBS, J.; FABEL, K. The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. **Curr Opin Psychiatry**, v. 21, n. 3, p. 290-5, May 2008. ISSN 0951-7367. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382230> >.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493-5, Apr 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087407> >.

KEMPERMANN, G.; WISKOTT, L.; GAGE, F. H. Functional significance of adult neurogenesis. **Curr Opin Neurobiol**, v. 14, n. 2, p. 186-91, Apr 2004. ISSN 0959-4388. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15082323> >.

KRAMER, K. J. et al. Insulin-like hypoglycemic and immunological activities in honeybee royal jelly. **J Insect Physiol**, v. 23, n. 2, p. 293-5, 1977. ISSN 0022-1910 (Print) 0022-1910.

KRASKA, A. et al. In vivo cross-sectional characterization of cerebral alterations induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46196, 2012. ISSN 1932-6203.

KUHN, H. G. et al. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. **J Neurosci**, v. 17, n. 15, p. 5820-9, Aug 01 1997. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking).

LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behav Neurosci**, v. 112, n. 5, p. 1199-208, Oct 1998. ISSN 0735-7044. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829797> >.

LAZARINI, F.; LLEDO, P. M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? **Trends Neurosci**, v. 34, n. 1, p. 20-30, Jan 2011. ISSN 1878-108X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980064> >.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**. Atheneu, 2010.

LEUNER, B. et al. Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 43, p. 17169-73, Oct 23 2007. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

LI, L.; HOLSCHER, C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. **Brain Res Rev**, v. 56, n. 2, p. 384-402, Dec 2007. ISSN 0165-0173 (Print) 0165-0173.

LIBERMAN, M. et al. Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 3, p. 463-70, Mar 2008. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162610> >.

LINDQVIST, A. et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. **Eur J Neurol**, v. 13, n. 12, p. 1385-8, Dec 2006. ISSN 1468-1331. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116226> >.

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 5, p. 2074-7, Mar 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446631> >.

LU, L. et al. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. **Exp Neurol**, v. 183, n. 2, p. 600-9, Oct 2003. ISSN 0014-4886. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14552901> >.

LYKO, F. et al. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. **PLoS Biol**, v. 8, n. 11, p. e1000506, 2010. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072239> >.

MALESZKA, R. Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees: the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks. **Epigenetics**, v. 3, n. 4, p. 188-92, 2008 Jul-Aug 2008. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719401> >.

MARKESBERY, W. R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 23, n. 1, p. 134-47, 1997. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849.

_____. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. **Arch Neurol**, v. 56, n. 12, p. 1449-52, Dec 1999. ISSN 0003-9942 (Print) 0003-9942.

MATHEWS, A. Why worry? The cognitive function of anxiety. **Behav Res Ther**, v. 28, n. 6, p. 455-68, 1990. ISSN 0005-7967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2076083> >.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 631-9, Aug 5 2004. ISSN 0028-0836.

MAYER, G.; NITSCH, R.; HOYER, S. Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. **Brain Res**, v. 532, n. 1-2, p. 95-100, Nov 5 1990. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993.

MCDONALD, H. Y.; WOJTOWICZ, J. M. Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. **Neurosci Lett**, v. 385, n. 1, p. 70-5, Sep 2005. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967575> >.

- MEHAN, S. et al. JNK: a stress-activated protein kinase therapeutic strategies and involvement in Alzheimer's and various neurodegenerative abnormalities. **J Mol Neurosci**, v. 43, n. 3, p. 376-90, Mar 2011. ISSN 0895-8696.
- MING, G. L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 687-702, May 26 2011. ISSN 0896-6273.
- MONTARON, M. F. et al. Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. **Neurobiol Aging**, v. 27, n. 4, p. 645-54, Apr 2006. ISSN 0197-4580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15953661> >.
- MORGADO, I. **Aprendizaje y Memoria: conceptos, categorías y sistema neurales**. In: **Neuroanatomia y fisiología das funciones cerebrales**. 1999. 827.
- MORRIS, J. K. et al. Impaired glycemia increases disease progression in mild cognitive impairment. **Neurobiol Aging**, v. 35, n. 3, p. 585-9, Mar 2014. ISSN 1558-1497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24411018> >.
- MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, May 1984. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6471907> >.
- MÜNSTEDT, K.; BARGELLO, M.; HAUENSCHILD, A. Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects. **J Med Food**, v. 12, n. 5, p. 1170-2, Oct 2009. ISSN 1557-7600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857086> >.
- NELSON, P. T. et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 71, n. 5, p. 362-81, May 2012. ISSN 1554-6578. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487856> >.
- O'LEARY, T. P.; BROWN, R. E. Visuo-spatial learning and memory deficits on the Barnes maze in the 16-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. **Behav Brain Res**, v. 201, n. 1, p. 120-7, Jul 2009. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428625> >.
- OAKLEY, H. et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. **J Neurosci**, v. 26, n. 40, p. 10129-40, Oct 2006. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17021169> >.
- OLTON, D. S. **Memory functions and the hippocampus**. In: Seifert W, editor. **Neurobiology of the hippocampus**. London: Academic Press. p 335–373. 1983.
- OTT, A. et al. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. **Diabetologia**, v. 39, n. 11, p. 1392-7, Nov 1996. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8933010> >.
- OVERSTREET WADICHE, L. et al. GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. **J Neurophysiol**, v. 94, n. 6, p. 4528-32, Dec 2005. ISSN 0022-3077. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033936> >.
- OVERSTREET-WADICHE, L. S. et al. Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. **J Neurosci**, v. 26, n. 15, p. 4095-103, Apr 2006. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611826> >.
- O' KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press, 1978.
- O'KEEFE, J.; NADEL, L.; WILLNER, J. Tuning out irrelevancy? Comments on Solomon's temporal mapping view of the hippocampus. **Psychol Bull**, v. 86, n. 6, p. 1280-9, Nov 1979. ISSN 0033-2909. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/515283> >.

PAGE, R. E., JR.; PENG, C. Y. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 4-6, p. 695-711, Apr 2001. ISSN 0531-5565 (Print) 0531-5565.

PARENT, J. M. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. **Neuroscientist**, v. 9, n. 4, p. 261-72, Aug 2003. ISSN 1073-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12934709> >.

PARIHAR, M. S.; HEMNANI, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. **J Clin Neurosci**, v. 11, n. 5, p. 456-67, Jun 2004. ISSN 0967-5868 (Print) 0967-5868.

PATHAN, A. R. et al. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. **Life Sci**, v. 79, n. 23, p. 2209-16, Nov 2 2006. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205.

PAVEL, C. I. et al. **Biological Activities of Royal Jelly - Review**: Pavel C. et. al./Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 2011, 44 (2) 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Academic Press, 1998. ISBN 9780125476195. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=2hp5QgAACAAJ> >.

PENCEA, V. et al. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. **J Neurosci**, v. 21, n. 17, p. 6706-17, Sep 2001. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517260> >.

PERRY, G.; CASH, A. D.; SMITH, M. A. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. **J Biomed Biotechnol**, v. 2, n. 3, p. 120-123, 2002. ISSN 1110-7243.

PHAM, K. et al. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 4, p. 879-86, Feb 2003. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603278> >.

PHILIPSON, O. et al. Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. **FEBS J**, v. 277, n. 6, p. 1389-409, Mar 2010. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20136653> >.

PINTON, S. et al. Sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin promotes anxiogenic behavior in mice. **Behav Brain Res**, v. 223, n. 1, p. 1-6, Sep 30 2011. ISSN 0166-4328.

PRADO M., et al. Envelhecimento e memória: foco na doença de Alzheimer. Revista USP. 2007.

PRINCE, M. J. et al. **World Alzheimer Report 2016 - Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, quality and costs now and in the future**. Alzheimer's Disease International. London, p.131. 2016

_____. **World Alzheimer Report 2015 - The Global Impact of Dementia : An analysis of prevalence, incidence, cost and trends**. Alzheimer's Disease International London, p.84. 2015

PYRZANOWSKA, J. et al. Long-term administration of Greek Royal Jelly improves spatial memory and influences the concentration of brain neurotransmitters in naturally aged Wistar male rats. **J Ethnopharmacol**, v. 155, n. 1, p. 343-51, Aug 2014. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882731> >.

QU, Z. Q. et al. Protective effects of a *Rhodiola crenulata* extract and salidroside on hippocampal neurogenesis against streptozotocin-induced neural injury in the rat. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29641, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22235318> >.

REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 3, p. 137-52, Mar 2011. ISSN 1759-4758.

ROBERT, R. et al. Engineered antibody intervention strategies for Alzheimer's disease and related dementias by targeting amyloid and toxic oligomers. **Protein Eng Des Sel**, v. 22, n. 3, p. 199-208, Mar 2009. ISSN 1741-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927231> >.

RODRIGUEZ, G. et al. Psychological and social aspects in management of Alzheimer's patients: an inquiry among caregivers. **Neurol Sci**, v. 24, n. 5, p. 329-35, Dec 2003. ISSN 1590-1874 (Print) 1590-1874.

ROSSI, C. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 7, p. 1850-6, Oct 2006. ISSN 0953-816X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040481> >.

RÖNNEMAA, E. et al. Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. **Neurology**, v. 71, n. 14, p. 1065-71, Sep 2008. ISSN 1526-632X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18401020> >.

SAHAY, A.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 9, p. 1110-5, Sep 2007. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726477> >.

SAHAY, A.; WILSON, D. A.; HEN, R. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 582-8, May 2011. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609817> >.

SALEHI, B.; CORDERO, M. I.; SANDI, C. Learning under stress: the inverted-U-shape function revisited. **Learn Mem**, v. 17, n. 10, p. 522-30, Oct 2010. ISSN 1549-5485. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20884754> >.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. **J Neural Transm**, v. 120, n. 1, p. 233-52, Jan 2013. ISSN 1435-1463. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22886150> >.

_____. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **J Neurochem**, v. 96, n. 4, p. 1005-15, Feb 2006. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412093> >.

SANTOS, A. M. G. **Aprendizagem e Memória no Labirinto Aquático de Morris**. In: Gilberto Fernando Xavier. (Org.). **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. 1ed. São Paulo: Plêiade, v. , p. 135-158 1999.

_____. **Aprendizagem e Memória no Labirinto Aquático de Morris**. NERVOSO, I. G. F. X. O. T. P. O. E. D. S. São Paulo: Plêiade: 135-158 p. 1999.

SANTOS, T. O. et al. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. **Physiol Behav**, v. 107, n. 3, p. 401-13, Oct 2012. ISSN 1873-507X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921433> >.

SARACENO, C. et al. Modeling Alzheimer's disease: from past to future. **Front Pharmacol**, v. 4, p. 77, 2013.

SAXENA, G.; PATRO, I. K.; NATH, C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: A protective role of nicotinic receptor. **Behav Brain Res**, v. 224, n. 1, p. 50-7, Oct 10 2011. ISSN 0166-4328.

SCHMUED, L. C.; HOPKINS, K. J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. **Brain Res**, v. 874, n. 2, p. 123-30, Aug 2000. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10960596> >.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**, v. 81, n. 2, p. 741-66, Apr 2001. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333.

SERRANO-POZO, A. et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, p. a006189, Sep 2011.

SHARIKABAD, M. N. et al. Effect of extracellular Mg(2+) on ROS and Ca(2+) accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, n. 1, p. H344-53, Jan 2001. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123250> >.

SHARMA, M.; GUPTA, Y. K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sci**, v. 68, n. 9, p. 1021-9, Jan 19 2001. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205.

SHOHAM, S. et al. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 836-43, Mar 2007. ISSN 0028-3908 (Print) 0028-3908.

_____. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. **Exp Neurol**, v. 184, n. 2, p. 1043-52, Dec 2003. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886.

SIERRA, A. et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 4, p. 483-95, Oct 8 2010.

SILVA, R. H.; FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. **J Neurosci Methods**, v. 102, n. 2, p. 117-25, Oct 2000. ISSN 0165-0270. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11040408> >.

SOHUR, U. S. et al. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1473, p. 1477-97, Sep 2006. ISSN 0962-8436. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16939970> >.

SONKUSARE, S. et al. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **Life Sci**, v. 77, n. 1, p. 1-14, May 20 2005. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205.

STOVER, K. R.; BROWN, R. E. Age-related changes in visual acuity, learning and memory in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. **Behav Brain Res**, v. 231, n. 1, p. 75-85, May 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22409975> >.

SUH, Y. H.; CHECLER, F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 3, p. 469-525, Sep 2002. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997.

SUN, P. et al. Long-Term Effects of Intracerebroventricular Streptozotocin Treatment on Adult Neurogenesis in the Rat Hippocampus. **Curr Alzheimer Res**, v. 12, n. 8, p. 772-84, 2015. ISSN 1875-5828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26159196> >.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, n. 6, p. 537-46, 2001. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408.

TANAPAT, P. et al. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. **J Neurosci**, v. 19, n. 14, p. 5792-801, Jul 1999. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407020> >.

_____. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. **J Comp Neurol**, v. 437, n. 4, p. 496-504, Sep 2001. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11503148> >.

TIWARI, V. et al. Chronic treatment with tocotrienol, an isoform of vitamin E, prevents intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment and oxidative-nitrosative stress in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 93, n. 2, p. 183-9, Aug 2009. ISSN 0091-3057.

- TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 31, n. 4, p. 959-62, Dec 1988. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3252289> >.
- TURNER, D. A. et al. Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. **Prog Neurobiol**, v. 55, n. 6, p. 537-62, Aug 1998. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9670217> >.
- UDA, M. et al. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. **Brain Res**, v. 1104, n. 1, p. 64-72, Aug 2006. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824490> >.
- VAN GROEN, T.; MIETTINEN, P.; KADISH, I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. **Hippocampus**, v. 13, n. 1, p. 133-49, 2003. ISSN 1050-9631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12625464> >.
- VAN HOESEN, G. W.; HYMAN, B. T. Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. **Prog Brain Res**, v. 83, p. 445-57, 1990. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2392569> >.
- VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 266-70, Mar 1999. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195220> >.
- VAN PRAAG, H. et al. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J Neurosci**, v. 25, n. 38, p. 8680-5, Sep 2005. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177036> >.
- VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nat Protoc**, v. 1, n. 2, p. 848-58, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406317> >.
- WEBSTER, S. J. et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. **Front Genet**, v. 5, p. 88, 2014. ISSN 1664-8021.
- WEINSTOCK, M.; SHOHAM, S. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. **J Neural Transm**, v. 111, n. 3, p. 347-66, Mar 2004. ISSN 0300-9564 (Print) 0300-9564.
- WHISHAW, I. Q.; MITTLEMAN, G. Visits to starts, routes, and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. **J Comp Psychol**, v. 100, n. 4, p. 422-31, Dec 1986. ISSN 0735-7036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3802786> >.
- WILSON, M. A.; MCNAUGHTON, B. L. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. **Science**, v. 261, n. 5124, p. 1055-8, Aug 1993. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8351520> >.
- WINNER, B.; KOHL, Z.; GAGE, F. H. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. **Eur J Neurosci**, v. 33, n. 6, p. 1139-51, Mar 2011. ISSN 1460-9568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395858> >.
- WOJTOWICZ, J. M.; KEE, N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1399-405, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406427> >.
- XAVIER, G. F. **A modularidade da memória e o sistema nervoso**. Psicologia USP, 1993.
- XAVIER, G. F.; COSTA, V. C. Dentate gyrus and spatial behaviour. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 762-73, Aug 2009. ISSN 1878-4216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375476> >.

XAVIER, G. F.; OLIVEIRA-FILHO, F. J.; SANTOS, A. M. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? **Hippocampus**, v. 9, n. 6, p. 668-81, 1999. ISSN 1050-9631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10641760> >.

ZAHMATKESH, E. et al. Protective effect of royal jelly on the sperm parameters and testosterone level and lipid peroxidation in adult mice treated with oxymetholone. **Avicenna J Phytomed**, v. 4, n. 1, p. 43-52, Jan 2014. ISSN 2228-7930. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25050300> >.

ZAMAMI, Y. et al. Royal jelly ameliorates insulin resistance in fructose-drinking rats. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 11, p. 2103-7, Nov 2008. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981581> >.

ZAMANI, Z. et al. Effect of Royal Jelly on spatial learning and memory in rat model of streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease. **Adv Biomed Res**, v. 1, p. 26, 2012. ISSN 2277-9175. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23210085> >.

ZHANG, W. J. et al. Impairment of hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats. **Acta Neurol Scand**, v. 117, n. 3, p. 205-10, Mar 2008. ISSN 0001-6314.

ZHAO, C. et al. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **J Neurosci**, v. 26, n. 1, p. 3-11, Jan 2006. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16399667> >.

ZHAO, W. et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. **J Biol Chem**, v. 274, n. 49, p. 34893-902, Dec 3 1999. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

ZHAO, W. Q. et al. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. **Eur J Pharmacol**, v. 490, n. 1-3, p. 71-81, Apr 19 2004. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999.

ZHAO, Y.; ZHAO, B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 316523, 2013.

ZILKENS, R. R. et al. Clinical epidemiology and in-patient hospital use in the last year of life (1990-2005) of 29,884 Western Australians with dementia. **J Alzheimers Dis**, v. 17, n. 2, p. 399-407, 2009. ISSN 1387-2877.