UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação dos efeitos da exposição prolongada às isoflavonas em ratas na senescência: aspectos comportamentais, bioquímicos e anatomopatológicos

Thaísa Meira Sandini

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa Dra Helenice de Souza Spinosa

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Avaliação dos efeitos da exposição prolongada às isoflavonas em ratas na senescência: aspectos comportamentais, bioquímicos e anatomopatológicos

Thaísa Meira Sandini

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa Dra Helenice de Souza Spinosa

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.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

S213 Sandini, Thaísa Meira
Avaliação dos efeitos da exposição prolongada às
isoflavonas em ratas na senescência: aspectos
comportamentais, bioquímicos e anatomopatológicos /
Thaísa Meira Sandini. - São Paulo, 2017.
174 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Spinosa, Helenice de Souza

1. Senescência. 2. Memória. 3. Isoflavonas. 4.
Comportamento. 5. Sistema Nervoso Central. I. T.
II. Spinosa, Helenice de Souza, orientador.

Thaísa Meira Sandini

Título: Avaliação dos efeitos da exposição prolongada às isoflavonas em ratas na senescência: Aspectos comportamentais, bioquímicos e anatomopatológicos

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Profa Dra. Helenice de Souza Spinosa
orientador /presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, _____ de _____ 2017

*"O que faz andar a estrada? É o sonho. Enquanto
a gente sonhar a estrada permanecerá viva. É
para isso que servem os caminhos, para nos
fazerem parentes do futuro."*

Mia Couto

À minha querida vó Gema (*in memoriam*) que não teve
a oportunidade de ser alfabetizada, mas que no
decorrer da minha vida, me proporcionou muito além
de livros e artigos. Agradeço imensamente o amor
incondicional, a bondade que brilhava nos seus lindos
olhos azuis, a sabedoria, a paciência, os conhecimentos
transmitidos e a imensa vontade de viver! A senhora
foi uma guerreira! Muito obrigada por tudo!

Aos meus pais, Nestor e Maria, agradeço por tudo que fizeram por mim ao longo da vida, aos ensinamentos transmitidos e as palavras de incentivo e conforto que me acompanharam ao longo da minha formação. Saber lidar com a saudade e a distância também foi um grande aprendizado! Muito obrigada por tudo!

Amo vocês!

*Ao Dani, meu eterno amor, amigo, companheiro de
todas as horas. Muito obrigada por estar sempre ao
meu lado, pela paciência, ajuda científica, por
compreender a minha ausência, sempre me incentivar
e acreditar em mim!!*

Amo você!!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Helenice de Souza Spinosa, pela confiança, liberdade, incentivo e orientação ao longo da minha formação acadêmica. Com certeza durante esta jornada adquiri uma bagagem de aprendizado científico e profissional ímpar! Muito obrigada!

À Prof. Dra. Martha Maria Bernardi pela atenção, ensinamentos, conversas e amizade ao longo desta jornada. Muito obrigada por tudo, foi um prazer desfrutar da tua sabedoria e disposição!

Aos demais professores do Departamento de Patologia que ajudaram de uma forma ou de outra, no decorrer destes anos.

As minhas queridas amigas, companheiras, Nati e Paulinha, muito obrigada pela companhia, troca de informações, ajuda nos experimentos e momentos de distração! Vocês me proporcionaram momentos inesquecíveis! Muito obrigada!

Ao meu querido amigo, Thiago Moirinho Reis, muito obrigada pela amizade que construímos ao longo desses anos, muito obrigada pelas trocas de informações científicas e não científicas! Com certeza é uma amizade que conquistei para a vida toda!

Aos amigos da “confra” e do VPT, Daniel Sanzio, Everton, Júlia, Nati, Paulinha, Sayuri e Thiago, obrigada pela amizade e troca de conhecimento! Vocês são “toppest”! Adoro todos vocês!

As minhas queridas alunas que ajudei a orientar durante a iniciação científica, Dani e Fabi! Obrigada pela confiança, amizade e carinho!

Aos demais amigos do VPT e da Toxico que conquistei ao longo desta jornada, em especial a Esther Ricci que me passou os primeiros ensinamentos no Biotério.

Ao Daniel Sanches pela amizade e ajuda na análise das lâminas histológicas.

À prof. Dra. Sayuri Miyamoto e ao aluno de doutorado Adriano de Britto Chaves Filho pela análise de oxi-lipidômica. Em especial, muito obrigada pela atenção e ajuda Adriano!

Ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório, do Departamento de Patologia pela análise das monoaminas e pela amizade!

Ao Prof. Dr. Ivo Lebrun e ao técnico Admilson Aparecido Da Cunha, do Instituto Butantã pela análise dos aminoácidos.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia, Herculano, Nicolle e Vagner pela ajuda e amizade aos longos desses anos!

Aos demais funcionários do Departamento de Patologia, em especial ao Luciano (Buga), Magali, Lu, Nelsinho e Mauro! Agradeço também a Elaine do Centro de Toxicologia Veterinária (CEPTOX – Pirassununga) pelo cuidado das ratas!

À secretária da Toxicologia, Samantha, pela sua atenção, dedicação e competência.

À Universidade de São Paulo, ao Programa de Toxicologia e Análises Clínicas e ao Departamento de Patologia Animal por me proporcionar o privilégio de desenvolver a minha tese!

À CAPES pelo apoio financeiro, imprescindível para o desenrolar deste projeto.

Aos demais amigos que conquistei ao longo desses anos, dentro e fora da USP, que escolhi para colorir a vida e que me dão força para sorrir e incentivo para enfrentar qualquer situação, apesar de não terem sido mencionados (porque são muitos), contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço à minha família, a todos os animais utilizados no decorrer deste trabalho, a vida e a Deus!

RESUMO

SANDINI, T.M. **Avaliação dos efeitos da exposição prolongada às isoflavonas em ratas na senescência: aspectos comportamentais, bioquímicos e anatomopatológicos.** 2017. 174f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O envelhecimento é um processo acompanhado por uma série de mudanças físicas, fisiológicas e psicológicas, além de ser caracterizado pelo declínio de diferentes funções motoras e cognitivas, que afetam a independência do idoso. Particularmente na mulher, um acompanhante inevitável do envelhecimento é a menopausa. Desse modo, é natural o interesse em medidas terapêuticas que possam ser utilizadas para minimizar os sintomas da menopausa, bem como o prejuízo motor e cognitivo. Assim, o presente estudo teve como objetivo (i) avaliar o efeito da idade nos aspectos comportamentais, neuroquímicos e de ácidos graxos poli-insaturados em ratas jovens (3 meses de idade), de meia-idade (12 meses de idade) e senescentes (18 meses de idade); e, (ii) avaliar os efeitos da administração prolongada (90 dias) de diferentes doses (50, 100 e 200 mg/kg/dia) de isoflavonas (ISOs) no perfil comportamental, na análise bioquímica sérica e de estradiol, na quantificação dos níveis de neurotransmissores encefálicos e achados anatomopatológicos em ratas de meia-idade. Os resultados da primeira etapa mostraram que: ratas com 12 e 18 meses de idade apresentaram: 1) diminuição da frequência de levantar e de *grooming* no campo aberto; 2) aumento do comportamento tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado e na caixa claro-escuro; 3) prejuízo na memória espacial observada no labirinto de Barnes; 4) diminuição, sobretudo, nos níveis de dopamina e de seus metabólitos no córtex pré-frontal (CPF), no hipotálamo, no hipocampo e no estriado; 5) diminuição dos níveis dos hidróxidos 12 e 15/14 do ácido araquidônico (AA) no CPF de ratas com 18 meses de idade. Esses dados em conjunto evidenciam prejuízo motor e cognitivo, aumento do comportamento tipo-ansioso, bem como redução nos níveis de monoaminas e dos hidróxidos do AA com o avanço da idade das ratas. Em relação ao tratamento prolongado com diferentes doses de ISOs em ratas de meia-idade, os resultados mostraram que:

1) não houve alterações motoras e no comportamento tipo-ansioso; 2) evidenciou melhora no desempenho cognitivo espacial; 3) mostrou aumento nos níveis séricos de estradiol e 4) promoveu aumento nos níveis de glutamato e de GABA no CPF e no hipotálamo. Esses achados sugerem que o tratamento prolongado com diferentes doses de ISOs em ratas de meia-idade, foi capaz de melhorar a performance cognitiva espacial e esse efeito pode ser associado ao aumento dos níveis de estrógeno, bem como ao aumento dos níveis de glutamato e de GABA no córtex pré-frontal e no hipotálamo, evidenciando também um possível efeito neuroprotetor das ISOs em ambas regiões.

Palavras-chave: Envelhecimento. Memória. Neurotransmissor. Comportamento. Fitoestrógenos. Menopausa.

ABSTRACT

SANDINI, T.M. **Evaluation of the effects of prolonged isoflavones exposure in rats on senescence: behavioral, biochemical and anatomopathological aspects.** 2017. 174f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Aging is a process accompanied by a series of physical, physiological and psychological changes, besides being characterized by the decline of different motor and cognitive functions, which affect the independence of the elderly. Specifically, in women, an inevitable companion of aging is menopause. Therefore, it is of high interest therapeutic procedures that can be used to reduce the symptoms of menopause, as well as motor and cognitive impairment. Thus, the present study aimed to (i) evaluate the effect of age on behavioral, neurochemical and polyunsaturated fatty acids aspects in young (3 months old), middle-aged (12 months old) and senescent (18 months of age) female rats; and (ii) to evaluate the effects of prolonged (90 days) administration of different doses (50, 100 and 200 mg/kg/day) of isoflavones (ISOs) in the behavioral profile, biochemical and estradiol serum analysis, brain neurotransmitters levels and anatomopathological findings in middle-aged rats. Our first results showed that rats at 12 and 18 months of age: 1) presented a decrease in rearing and grooming frequency in the open field; 2) increase of anxiety-like behavior in the elevated plus maze and light-dark box; 3) spatial memory impairment observed in the Barnes maze; 4) a decrease mainly in the levels of dopamine and its metabolites in the prefrontal cortex (PFC), hypothalamus, hippocampus and striatum; 5) decreased levels of 12 and 15/14 arachidonic acid (AA) hydroxides in the PFC in 18-month old rats. These data altogether show motor and cognitive impairment, increase in anxiety-like behavior, as well as reductions in monoamine levels and AA hydroxides as the rat age progresses. Regarding the prolonged treatment with different doses of ISOs in middle-aged rats, the results showed that: 1) there were no motor or anxiety-like behavior alterations; 2) there was an improvement in spatial cognitive performance; 3) increase in serum estradiol levels and 4) increase in glutamate and GABA levels in the PFC and hypothalamus. These findings suggest that prolonged treatment with different doses of ISOs could

improve spatial cognitive performance and that this effect may be associated with increased estrogen levels, as well as increased levels of glutamate and GABA in the prefrontal cortex and hypothalamus, evidencing a possible neuroprotective effect of ISOs in both regions.

Keywords: Aging. Memory. Neurotransmitter. Behavior. Phytoestrogens. Menopause.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ilustração dos eventos moleculares envolvidos na fase inicial e tardia da potenciação de longa duração.....	34
Figura 1.2. Síntese das catecolaminas.	35
Figura 1.3. Síntese do ácido gama-aminobutírico (GABA) a partir do glutamato.	39
Figura 1.4. Campo aberto	48
Figura 1.5. Labirinto em cruz elevado	49
Figura 1.6. Caixa claro-escuro.	50
Figura 1.7. Ilustração do protocolo utilizado no teste de reconhecimento de objetos.....	52
Figura 1.8. Ilustração do labirinto de Barnes.....	53
Figura 1.9. Cromatograma demonstrando os picos correspondentes à análise obtida das monoaminas (NOR, DA e 5-HT) e de seus metabólitos (VMA, DOPAC, 5HIAA e HVA).....	57
Figura 1.10. Cromatograma demonstrando os picos correspondentes à análise obtida dos aminoácidos (glutamato e ácido gama aminobutírico - GABA).	57
Figura 1.11. Parâmetros do comportamento na caixa claro-escuro de ratas com diferentes idades.	65
Figura 1.12. Avaliação da memória tipo episódica no teste de reconhecimento de objetos de ratas com diferentes idades.	66
Figura 1.13. Desempenho no labirinto de Barnes durante os dias de treino e no dia do teste em ratas com diferentes idades.	68
Figura 1.14. Avaliação dos níveis séricos de estradiol em ratas com diferentes idades.....	68
Figura 1.15. Perfil dos hidróxidos (em pg/mg de tecido) do ácido docosahexaenóico (HDoHE), do ácido linoleico (HODE), do ácido oleico (HOA) e do ácido araquidônico (HETE) no córtex pré-frontal de ratas com 12 e 18 meses de idade.....	75
Figura 2.1. Estrutura química das isoflavonas mostrando os anéis benzênicos (A e B) unidos por um anel heterocíclico (C) e de diferentes compostos.	92

Figura 2.2. Estrutura química da isoflavona e do estradiol.....	93
Figura 2.3. Biotransformação da genisteína e daidzeína	95
Figura 2.4. Peso corpóreo (g), consumo de ração (g) e hídrico (mL) de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.	111
Figura 2.5. Parâmetros avaliados na caixa claro-escuro em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.....	114
Figura 2.6. Desempenho no labirinto de Barnes durante os dias de treino e no dia do teste em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.	115
Figura 2.7. Concentração sérica de estradiol (pg/mL) em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.....	117
Figura 2.8. Níveis de glutamato e GABA (ug/g de tecido) no córtex pré-frontal (A) e no hipotálamo (B) em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Parâmetros da atividade geral em campo aberto de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.....	62
Tabela 1.2. Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.....	63
Tabela 1.3. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no córtex pré-frontal de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.	71
Tabela 1.4. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no hipotálamo de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.	72
Tabela 1.5. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no hipocampo de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.	73
Tabela 1.6. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no estriado de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.....	74
Tabela 2.1. Parâmetros avaliados no campo aberto em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.	112
Tabela 2.2. Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.	113
Tabela 2.3. Parâmetros bioquímicos de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.	

Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

..... 116

Tabela 2.4. Peso relativo (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média

..... 118

Tabela 2.5. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no hipotálamo de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão..... 120

Tabela 2.6. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no hipocampo de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão..... 121

Tabela 2.7. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no estriado de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão..... 122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HIAA - ácido 5-hidroxindolacético

5-HT - serotonina

AA - ácido araquidônico

Ach - acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

AG - ácidos graxos

AMPc - monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA - análise de variância

BA - braços abertos

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

BF - braços fechados

CA - campo aberto

CaMK II - proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina de AMPc

CCE - caixa claro-escuro

CE - caixa de escape

CPF - córtex pré-frontal

CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc

DA - dopamina

DHA - ácido docosahexaenóico

DOPAC - ácido 3,4, dihidroxifenilacético

EPA - ácido eicosapentaenoico

GABA - ácido gama-aminobutírico

HDoHE - hidróxidos do ácido docosahexaenóico

HETE – hidróxidos do ácido araquidônico

HOA – hidróxidos do ácido oleico

HODE – hidróxidos do ácido linoleico

HpDoHE - hidroperóxidos do ácido docosahexaenóico

HVA - ácido homo-vanílico

ID - índice de discriminação

IP - índice de preferência

ISOs - isoflavonas

LB - labirinto de Barnes
LCE - labirinto em cruz elevado
MB - metabólitos
NA - norepenifrina ou noradrenalina
NE – número de erros
NMDA - N-metil D-Aspartato
NT - neurotransmissores
OF - objeto familiar
ON - objeto novo
PKC - proteína quinase C
PUFAs - ácidos graxos poli-insaturados
REs - receptores de estrógenos
RL - radicais livres
RNS - espécies reativas de nitrogênio
RO - teste de reconhecimento de objeto
ROS - espécies reativas de oxigênio
SERMs - moduladores seletivos naturais dos receptores de estrogênio
SNC - Sistema Nervoso Central
VMA - ácido vanil-mandélico
ZC - zona central
ZI - zona intermediária
ZP - zona periférica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	24
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IDADE NOS ASPECTOS COMPORTAMENTAL, NEUROQUÍMICO E DE ÁCIDOS GRAXOS EM RATAS JOVENS (3 MESES DE IDADE), DE MEIA-IDADE (12 MESES DE IDADE) E SENESCENTES (18 MESES DE IDADE)	27
1.1 INTRODUÇÃO	27
1.1.2 Aprendizado e Memória	29
1.1.3 Sistemas de neurotransmissão e senescência	34
1.1.4 Ácidos graxos, memória e senescência	40
1.2 OBJETIVOS	46
1.2.1 Objetivos Específicos	46
1.3 MATERIAL E MÉTODOS	47
1.3.1 Animais	47
1.3.2 Avaliação comportamental	47
1.3.3 Análise sérica de estradiol	53
1.3.4 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos	54
1.3.5 Metodologia para extração lipídica para análise de oxi-lipidômica ...	57
1.4 Análise Estatística	60
1.5 RESULTADOS	61
1.5.1 Avaliação comportamental	61
1.5.2 Análise sérica de estradiol	68
1.5.3 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos	69
1.5.4 Análise de oxi-lipidômica por cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) ionização por electrospray (ESI) e espectrometria de massa de tempo de voo (TOFMS)	74
1.6 DISCUSSÃO	76
1.7 CONCLUSÕES	89
CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PROLONGADA (90 DIAS) DE ISOFLAVONAS (ISOs) EM RATAS COM 12 MESES DE IDADE	90
2.1 INTRODUÇÃO	90

2.1.1 A soja (Glycine max): ISOFLAVONA	91
2.1.2 Farmacocinética das ISOs	94
2.1.3 Efeitos biológicos das ISOs	98
2.1.4 ISOs e menopausa	100
2.2 OBJETIVOS.....	104
2.2.1 Objetivos Específicos.....	104
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	105
2.3.1 Animais	105
2.3.2 Isoflavonas (ISOs)	105
2.3.3 Avaliação clínica, do consumo de água e de ração, e mensuração do peso corpóreo.....	106
2.3.4 Avaliação comportamental.....	106
2.3.5 Análise sérica de bioquímica e de estradiol.....	106
2.3.6 Estudo anatomopatológico	107
2.3.7 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos ...	107
2.4 Análise Estatística.....	108
2.5 RESULTADOS	109
2.5.1 Avaliação clínica, do consumo de água, ração, e mensuração do peso corpóreo.....	109
2.5.2 Avaliação comportamental.....	112
2.5.3 Análise sérica de bioquímica e de estradiol.....	116
2.5.4 Estudo anatomopatológico	117
2.5.5 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos ...	118
2.6 DISCUSSÃO.....	123
2.7 CONCLUSÕES.....	132
REFERÊNCIAS	133
ANEXOS	172

INTRODUÇÃO GERAL

O envelhecimento é um processo multifatorial e complexo, que envolve diversas alterações em níveis genéticos, celulares e moleculares que acarretam mudanças estruturais no encéfalo senescente (SALEEM et al., 2014). O envelhecimento natural está associado a um lento declínio das funções exercidas pelo sistema nervoso central (SNC), tais como o desempenho sensorial e motor, a perda progressiva da memória, a demência e disfunções cognitivas (PAPANDREOU et al., 2011).

Dentre as funções que são comprometidas ao longo da senescência, a memória tem ganho grande destaque, uma vez que esta é uma parte essencial da vida e constitui a maior conquista do ser humano. A memória inclui aprendizagem e formação de conhecimento, constituindo assim, um fator determinante do comportamento, levando a seleção das reações mais apropriadas às demandas do ambiente (TOMAZ, 1993). Dessa forma, a nossa individualidade é resultado da “bagagem” de conhecimentos que adquirimos ao longo da nossa vida, bem como da cultura que herdamos. Nesse sentido, o comprometimento da função cognitiva ou a sua incapacidade, podem culminar na perda de habilidades cognitivas essenciais para uma vida independente (MORAES, 2008).

Ressalta-se que no decorrer do envelhecimento, diversas mudanças anatômicas macro- e microscopicamente ocorrem no encéfalo, como, por exemplo, o peso e o volume, o aspecto dos giros e sulcos, o volume dos ventrículos, o tamanho e o número dos neurônios (Lent, 2001, Oliveira 2001, Cançado e Horta, 2002). Além disso, mudanças fisiológicas e celulares, como alterações dendríticas, acúmulo de radicais livres nos neurônios e nas células da glia, redução dos níveis de neurotransmissores e alterações no perfil de ácidos graxos desempenham importante papel no envelhecimento senescente, bem como no envelhecimento senil. Dessa forma, todas estas alterações podem afetar diretamente ou indiretamente as conexões neurais, além de perturbar a homeostase estrutural, causando, conseqüentemente,

prejuízo ou morte neuronal, acarretando nas alterações motoras e cognitivas observadas no indivíduo senescente. Nesse sentido, estudos em modelos animais, longitudinais, com diferentes faixas etárias, que foquem no envelhecimento espontâneo e nas mudanças comportamentais e cognitivas que ocorrem ao longo da senescência têm se tornado cada vez mais importante.

Sabe-se que todas essas mudanças que ocorrem na senescência refletem diretamente na funcionalidade do idoso e um componente inevitável do envelhecimento que acomete, em particular, as mulheres, é a menopausa. Com aumento da expectativa de vida da população, as mulheres passaram a sobreviver um tempo suficiente para vivenciar os efeitos da menopausa, o que gerações anteriores não conseguiram experimentar (VIGETA; BRÊTAS, 2004). O declínio na produção de estrógeno é acompanhado por uma série de sintomas físicos e mudanças desfavoráveis no metabolismo de lipídeos, de glicose e ósseo, bem como contribui para o surgimento de doenças cardiovasculares, alterações de humor e da função cognitiva (DAVIS et al., 2015).

Dessa forma, para minimizar os sintomas da menopausa, tem-se recorrido à terapia de reposição hormonal, no entanto, a segurança no uso de hormônios sintéticos ainda é incerta. Nesse sentido, vem se destacando como uma alternativa terapêutica para o tratamento dos sintomas da menopausa, o uso das isoflavonas (ISOs), pois estas apresentam menos efeitos colaterais que os hormônios exógenos. A grande vantagem destes compostos é que são produtos naturais e apresentam capacidade de serem moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERMs) (CEDERROTH; NEF, 2009).

Os estudos realizados até o presente momento têm demonstrado os efeitos benéficos da reposição hormonal com ISOs em relação à osteoporose, diferentes tipos de cânceres, sintomas da menopausa, metabolismo de lipídeos e de glicose, e doenças cardiovasculares. Mais recentemente, o interesse nestes compostos tem aumentado, uma vez que estudos em modelos animais têm mostrado que estes podem ser usados para retardar ou evitar o declínio cognitivo associado ou não à doença de Alzheimer (BANSAL; PARLE, 2010b; BAGHERI et al., 2011; DING et al., 2011; DING et al., 2013; YUAN-DI et al., 2013). Contudo, estudos que avaliem os efeitos da suplementação com

ISOs em modelos animais com déficit cognitivo espontâneo ainda são escassos. Nesse sentido, utilizamos ratas com 12 meses de idade, que apresentam prejuízo cognitivo espontâneo, para avaliar os efeitos da exposição prolongada das ISOs sob a esfera comportamental, bioquímica sérica e de estradiol, bem como nos níveis de neurotransmissores encefálicos.

A tese foi elaborada na forma de dois capítulos. O primeiro capítulo apresenta o efeito da idade nos aspectos comportamentais, neuroquímicos e de ácidos graxos em ratas jovens (3 meses de idade), de meia-idade (12 meses de idade) e senescentes (18 meses de idade). Nesse capítulo, a revisão da literatura aborda conceitos de envelhecimento e de memória, descreve o processo de memória, bem como as mudanças que ocorrem com o envelhecimento, principalmente a nível de neurotransmissores e de ácidos graxos.

O segundo capítulo da tese apresenta os efeitos da avaliação do perfil comportamental, da análise sérica bioquímica e de estradiol, e dos níveis de neurotransmissores em ratas de meia-idade que foram tratadas prolongadamente (90 dias) com diferentes doses (50, 100 e 200 mg/kg/dia) de isoflavonas (ISOs), por via oral. Nesse capítulo, a revisão da literatura apresenta as ISOs, a sua farmacocinética, como desencadeia os seus efeitos biológicos e na menopausa.

Cada um dos capítulos apresenta revisão da literatura, objetivos, material e métodos, resultados e discussão. Ao término do Capítulo 2 é apresentada as referências referentes a ambos capítulos.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA IDADE NOS ASPECTOS COMPORTAMENTAL, NEUROQUÍMICO E DE ÁCIDOS GRAXOS EM RATAS JOVENS (3 MESES DE IDADE), DE MEIA-IDADE (12 MESES DE IDADE) E SENESCENTES (18 MESES DE IDADE)

1.1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um fenômeno universal e pode ser definido como a mudança na estrutura etária da população, onde observa-se aumento do peso relativo de pessoas acima de determinada idade, considerada como definidora do início da velhice (CARVALHO; GARCIA, 2003). Com relação ao processo de envelhecimento, sabe-se que nos países desenvolvidos este ocorreu de forma mais lenta, em um cenário de crescimento econômico e pouca desigualdade social. No entanto, atualmente, alcançar à velhice é uma realidade populacional mesmo para os países mais pobres (VERAS, 2009).

O Brasil, um país em desenvolvimento, vem obtendo um crescimento rápido no que diz respeito ao seu envelhecimento populacional, particularmente nos últimos 50 anos (PASKULIN et al., 2011). Em 1960 o número de idosos no Brasil era cerca de 3 milhões, em 1975 houve um aumento para 7 milhões, sendo que, em 2008 esse número foi estimado em 20 milhões de indivíduos com mais de 60 anos de idade, ou seja, houve um crescimento nessa faixa etária de quase 700% (VERAS, 2009). Segundo Paskulin et al. (2011), as projeções indicam que para 2050, cerca de 30% da população brasileira terá mais de 60 anos de idade, indicando que o Brasil será um dos países com maior número absoluto de idosos no mundo.

Com relação ao processo de envelhecimento, ressalta-se que os indivíduos envelhecem de formas diferentes, conforme especificidades socioeconômicas, culturais, ambientais, individuais e/ou coletivas, segundo

épocas e lugares (ALVES; VIANNA, 2010). Nesse contexto, pode-se dizer que além da idade cronológica propriamente dita, tem-se a idade biológica, social e psicológica (SCHNEIDER; IRIGARAY, 2008). A idade cronológica refere-se somente ao número de anos que tem decorrido desde o nascimento, já a idade biológica é marcada pelas modificações físicas e biológicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento humano e caracterizam o processo de senescência. A idade social pode ser definida pela obtenção de hábitos e *status* social atribuídos pelo indivíduo em relação às pessoas de sua idade, em sua cultura e em seu grupo social (SCHNEIDER; IRIGARAY, 2008), ou seja, está diretamente relacionada à capacidade funcional em contribuir na sociedade. Nesse momento, vale a pena comentar que esferas sociais podem influenciar positivamente a capacidade cognitiva, uma vez que estudos apontam que idosos (homens) inseridos em redes sociais e com altos níveis de atividade social são menos propensos ao declínio cognitivo quando comparados as suas companheiras que não exercem tal inserção social (BARNES et al., 2004). No que diz respeito à idade psicológica, esta depende de como cada indivíduo avalia a presença ou a ausência de marcadores biológicos, sociais e psicológicos decorrentes do envelhecimento em comparação a outras pessoas de sua idade (BATISTONI; NAMBA, 2010). Outra classificação que tem sido utilizada é a da idade funcional, isto é, o quanto uma pessoa funciona em um ambiente físico e social em comparação a outras de mesma idade cronológica (SCHNEIDER; IRIGARAY, 2008).

No que diz respeito às alterações macroscópicas e microscópicas, sabe-se que estas não ocorrem da mesma forma nas diferentes regiões do SNC, bem como, também não são uniformes no encéfalo senescente (PETERS, 2006). Com relação às alterações macroscópicas, um estudo longitudinal realizado com adultos jovens (30 anos) e idosos (60 anos) mostrou maior redução do volume do córtex pré-frontal (CPF), seguido do estriado; verificou-se também redução do lobo temporal, verme cerebelar e hipocampo (SCAHILL et al., 2003). Nesse mesmo estudo, verificou-se que nos homens os lobos frontais e temporais foram mais afetados, enquanto nas mulheres a redução do volume foi mais evidente nos lobos parietais e hipocampo. Além disso, estudos apontaram diminuição do volume das substâncias branca e cinzenta em indivíduos mais velhos (50-86 anos de idade), em ambos os sexos (GE et al., 2002). No entanto, Ge et al.

(2012) observaram que a substância cinzenta diminui linearmente com a idade, enquanto, a diminuição do volume da substância branca foi mais evidente a partir da meia idade.

Do ponto de vista fisiológico, o processo de envelhecimento ocorre por diversos mecanismos que afetam principalmente o funcionamento do SNC, devido às alterações morfofuncionais, histológicas e de neurotransmissores. As bases biológicas do processo de envelhecimento são abordadas por diferentes teorias; dentre estas, se destacam as teorias estocásticas, baseadas no acúmulo aleatório de moléculas com alterações estruturais ou funcionais, e as teorias não-estocásticas relacionadas com mecanismos programados no genoma de cada organismo (WEINERT; TIMIRAS, 2003; LEE et al., 2006). As teorias estocásticas estão relacionadas com a produção excessiva de radicais livres (RL), lesão mitocondrial, alteração do colágeno, lesão de membrana, mutação genética e “erro catastrófico” na síntese de proteínas, bem como com alterações neuroendócrinas e/ou imunológicas (WEINERT; TIMIRAS, 2003; LETIEMBRE et al., 2007). Com relação às teorias não-estocásticas, ressalta-se a teoria da senescência programada que foi proposta na década de 1970, e baseia-se na deterioração do programa genético que regula o desenvolvimento celular (WEINER, TIMIRAS, 2003).

Dentre as diversas alterações que acometem a funcionalidade do idoso, o declínio da reserva cognitiva tem ganhado grande destaque no meio científico, uma vez que acomete a autonomia do indivíduo idoso. Dessa forma, capacidades cognitivas prejudicadas pela senescência, como o aprendizado e a memória, tem sido alvo de diversas pesquisas pré-clínicas e clínicas.

1.1.2 Aprendizado e Memória

A capacidade de armazenar informações tornou-se uma vantagem evolutiva para os seres vivos, permitindo que estes se beneficiassem de experiências vividas para resolver problemas provenientes do meio ambiente garantindo, conseqüentemente, melhor adaptação. No que diz respeito aos seres humanos, a memória apresenta um papel ainda mais nobre, uma vez que armazena nossa história pessoal, permitindo que crescamos e mudemos ao

longo da vida (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000). Dessa forma, as memórias são parte essencial da vida, constituindo um fator determinante do comportamento, levando a seleção das reações mais apropriadas às demandas do ambiente, e é o que denota a capacidade de cada indivíduo ser único (TOMAZ, 1993).

A memória é a capacidade de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente (LENT, 2010), ou seja, é uma parte essencial da vida, enquanto algumas duram indefinidamente e outras desaparecem ao longo do tempo (DOYLE; KIEBLER, 2011).

O aprendizado e a memória “caminham” juntos, uma vez que o aprendizado é o processo através do qual se adquire conhecimento sobre o mundo e a memória é o processo pelo qual o conhecimento adquirido é codificado, armazenado e recuperado (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2000). Dessa forma, o aprendizado pode ser definido como uma mudança relativamente permanente no comportamento resultante de uma experiência (SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010), enquanto a memória corresponde à capacidade de lembrar experiências passadas que levam à alteração do comportamento (HELENE; XAVIER, 2003; SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010). No que diz respeito à cognição, este é um termo amplo utilizado aos processos de memória, associação, linguagem, atenção, formação de conceitos e resolução de problemas (WEISER; BUTT; MOHAJERI, 2016).

A memória é um processo que inclui vários estágios como a aquisição, a consolidação, a retenção e a recuperação de uma informação (ABEL; LATTAL, 2001), sendo cada um destes estágios, importante para a formação da memória. A fase de aquisição também denominada “aprendizagem” é o primeiro estágio que resulta em uma representação de memória, recém-construída e inicialmente lábil. Na fase de consolidação, a memória recente será reforçada e transformada em uma forma mais estável e persistente, sendo integrada a redes de conhecimento pré-existente. Esse processo é complexo e requer reações bioquímicas e ativação de várias proteínas e vias de sinalizações interdependentes, que culminam na memória de longa duração (ABEL; LATTAL, 2001; DUDAI, 2004). Após a consolidação, as memórias ficam acessíveis à recuperação, no entanto, nem sempre a memória poderá ser recuperada após a consolidação, pois estas podem ter sua retenção prejudicada se houver bloqueio

na síntese de proteínas, alterações nos receptores excitatórios glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil D-Aspartato) bem como, na liberação de neurotransmissores (ABEL; LATTAL, 2001; TRONSON et al., 2006).

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo de duração e o seu conteúdo. Com relação ao tempo que permanecem armazenadas, as memórias são classificadas em memória de trabalho, de curta e de longa duração. A memória de trabalho também denominada operacional, promove um armazenamento temporal limitado e não forma arquivos duradouros, ou seja, é rápida. Esse tipo de memória estabelece circuitos neuronais em distintas regiões encefálicas, como no córtex pré-frontal, córtex entorrinal, hipocampo e a amígdala (KANE; ENGLE, 2002). Além disso, requer também transmissão glutamatérgica mediada pelos receptores do tipo NMDA (WANG, 1999). Na memória de curta duração, as informações permanecem armazenadas por um curto período de tempo (minutos ou horas), suprimindo os processos mnemônicos, podendo posteriormente ser esquecidas ou transferidas para a memória de longo prazo (ALBERINI; MILEKIC; TRONEL, 2006; COWAN, 2008). As memórias de longa duração podem ser recordadas durante dias, meses ou anos após terem sido consolidadas (RANGANATH; BLUMENFELD, 2005; IZQUIERDO et al., 2013). A memória de curta duração envolve processos bioquímicos breves no hipocampo e córtex entorrinal, enquanto a memória de longa duração requer uma sequência de eventos moleculares no hipocampo e nos núcleos amigdalíacos (IZQUIERDO et al., 2013).

No que diz respeito ao conteúdo, as memórias são classificadas em explícitas ou declarativas e implícitas ou não declarativas, ambas de longa duração. A memória explícita ou declarativa é aquela que inclui conhecimentos, fatos que possam ser relatados ou contados por nós, ou seja, inclui o conhecimento sobre a história pessoal e o mundo que nos rodeia. Esse tipo de memória está disponível para evocação consciente e é dividido em memória episódica e semântica, sendo que a primeira requer lembrança de uma experiência previa, ou seja, está relacionada com a capacidade de consolidar informações sobre eventos e fatos ocorridos e situá-los no tempo; são as autobiografias (TULVING, 2001; 2002). Ressalta-se que a memória episódica é facilmente prejudicada pela senescência (SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010). No que diz respeito a memória semântica, sabe-se que esta é

adquirida durante o tempo e está relacionada a informações independentes do contexto, como conhecimentos geográficos, aritméticos, culturais, linguísticos e verbais (MOSCOVITCH et al., 2005). A memória semântica aumenta gradualmente em indivíduos de meia idade, porém diminui drasticamente em indivíduos mais idosos (> 80 anos de idade) (PETERS, 2006). As memórias declarativas requerem participação do lobo temporal, de várias regiões corticais, bem como do hipocampo que exerce papel fundamental na formação e recuperação, principalmente das memórias episódicas (RYAN et al., 2008; IZQUIERDO et al., 2013).

As memórias implícitas ou não declarativas não estão disponíveis para evocação consciente e necessitam de experiências prévias. Esse tipo de memória pode ser dividido em quatro subtipos: memória de representação perceptual ou *priming* que corresponde à imagem de um evento, preliminar à compreensão do que ele significa; a memória de procedimentos que requer habilidades e hábitos. Ainda tem duas classificações importantes que se relacionam a algum tipo de resposta ou comportamento, como a memória associativa, que está relacionada a formação de associações entre eventos e respostas condicionadas simples, e a memória não associativa que requer habituação e estímulos (MOSCOVITCH et al., 2005). As memórias implícitas são mediadas pelas estruturas neurais envolvidas na aquisição de informações, como o neocórtex posterior para a percepção de objetos, rostos e palavras, e os gânglios da base e o cerebelo para a função motora (SCHACTER; BADGAIYAN, 2001; MOSCOVITCH et al., 2005).

Com relação ao processo de formação da memória, sabe-se que este envolve eventos moleculares que ocorrem em diferentes regiões do SNC, principalmente no hipocampo e o CPF (PRESTON; EICHENBAUM, 2013). Alterações na liberação de neurotransmissores, nas proteínas e a eficiência na comunicação entre neurônios no hipocampo, córtex e outras estruturas encefálicas parecem ser eventos primordiais para a formação da memória ((MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Já está bem estabelecido em roedores que o hipocampo, principalmente a região CA1 é de grande importância tanto na fase de aquisição, bem como na fase de consolidação e evocação da memória (ABEL; LATTAL, 2001; IZQUIERDO et al., 2013). A sequência de eventos

moleculares nessa região para a formação da memória se assemelha ao processo de potenciação de longa duração, que é o aumento da resposta de um grupo de neurônios desencadeada pela sua estimulação repetitiva por alguns segundos durante a consolidação da memória (IZQUIERDO et al., 2013). A potenciação de longa duração tem sido amplamente estudada no envolvimento do processo de aprendizado e memória, bem como no envolvimento da plasticidade sináptica (CLARKE et al., 2010).

Os eventos moleculares que fazem parte da fase inicial e final da potenciação de longa duração iniciam com a estimulação de receptores de glutamato do tipo NMDA que ocorrem por meio da despolarização pós-sináptica através de receptores AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), permitindo a entrada do íon cálcio (Ca^{2+}) para o neurônio pós-sináptico (Figura 1.1). Após a entrada de Ca^{2+} , ocorre a ativação de proteína quinase C (PKC), tirosina quinase, proteína quinase dependente de cálcio/calmodolina (CaMK II) e calcineurina. A fase de potenciação de longa duração tem início quando a adenilato ciclase é ativada pelo Ca^{2+} , acarretando em aumento dos níveis de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina), que, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA), que, em seguida, transcola-se para o núcleo, fosforilando CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc) (ABEL; LATTAL, 2001) – Figura 1.1. Além disso, outras proteínas quinases (CAMK II, CAMK IV, MAP quinase) também podem regular essa expressão gênica. Sabe-se que essas proteínas exercem papel fundamental na aquisição e consolidação, no entanto, até o momento se desconhece o seu papel na reconsolidação da memória (ABEL; LATTAL, 2001). Ressalta-se que, as etapas para os processos de formação da memória, bem como a sinalização celular podem ser modulados por outros neurotransmissores. Segundo Izquierdo et al. (2013), a estimulação excessiva da via serotoninérgica ou a inibição das vias dopaminérgica ou noradrenérgica podem cancelar a formação definitiva de uma memória horas depois de ter sido adquirida.

Figura 1.1. Ilustração dos eventos moleculares envolvidos na fase inicial e tardia da potenciação de longa duração.

Legenda: proteína quinase C (PKC), proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK II – CaMK IV), monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), proteína quinase A (PKA), proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), ativador da proteína de ligação (C/EBP).

Fonte: Sandini (2017) adaptado de ABEL, LATTAL, (2001).

1.1.3 Sistemas de neurotransmissão e senescência

Sabe-se que com o passar da idade ocorre uma série de alterações neuronais, de proteínas e de receptores, as quais acarretam profundo impacto sobre os diferentes sistemas de neurotransmissão. Saliente-se que os sistemas de neurotransmissão, principalmente mediados pela dopamina (DA), ácido

gama-aminobutírico (GABA), glutamato e acetilcolina (Ach) desempenham importante papel na formação e manutenção da memória (SEGOVIA et al., 2001). Com relação ao papel da noradrenalina (ou norepinefrina – NA), sabe-se que esta catecolamina está fortemente atrelada a memória emocional e parece ser importante no processo de consolidação da memória (VAN STEGEREN, 2008). Já a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) tem sido associada principalmente com a regulação do sono e com as desordens de humor ((MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008).

Vale a pena destacar que as catecolaminas (DA, NA e adrenalina) compartilham a mesma via de síntese (Figura 1.2), diferenciando-se apenas pelo estágio em que a reação cessa em determinado neurônio, pela distribuição anatômica, bem como pelas suas funções. O processo de síntese inclui modificações sequenciais do aminoácido tirosina, que inicia com a hidroxilação e descarboxilação deste aminoácido. A tirosina pode ser obtida diretamente através da dieta (proteínas) ou indiretamente por meio da transformação da fenilalanina (PARENTE, 2006).

Figura 1.2. Síntese das catecolaminas.

Fonte: Sandini (2017).

A DA está é um neurotransmissor catecolaminérgico que está envolvido em inúmeros processos fisiológicos do SNC tais como movimento voluntário, alimentação, recompensa, sono, atenção, memória de trabalho e aprendizagem (BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015). Na periferia, a DA desempenha funções fisiológicas importantes na regulação hormonal, do olfato, da retina, na regulação de funções cardiovasculares, imunológicas renais e gastrointestinais (MISSALE et al., 1998; WITKOVSKY, 2004; IVERSEN; IVERSEN, 2007; BEAULIEU; ESPINOZA; GAINETDINOV, 2015). As ações fisiológicas da DA são mediadas por cinco receptores distintos (D1, D2, D3, D4 e D5), porém estreitamente relacionados que são acoplados a proteína G; esses receptores são divididos em duas famílias: os receptores da família D1 (D1 e D5) e os receptores da família D2 (D2, D3 e D4) (VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000).

Uma das principais causas do déficit motor, bem como do declínio cognitivo observado com o passar da idade está associado a diminuição dos níveis de DA (VOLKOW et al., 1998; BÄCKMAN et al., 2006; BÄCKMAN et al., 2010). Sabe-se que os neurônios dopaminérgicos são os mais afetados ao longo do envelhecimento, especialmente no estriado, uma vez que os níveis de DA diminuem cerca de 8% a cada década a partir da idade adulta (MUKHERJEE et al., 2002; MORCOM et al., 2010). Segundo Bäckman et al. (2006), o declínio de DA observado no estriado com o aumento da idade, parece ser decorrente da diminuição das sinapses, bem como da diminuição dos transportadores de DA. Além disso, estudos de neuroimagem, realizados especialmente por tomografia por emissão de pósitrons (PET), demonstraram o que com o aumento da idade há redução significativa dos receptores D1 e D2 em diversas regiões encefálicas (WANG et al., 1998; KAASINEN et al., 2000).

A NA é uma catecolamina produzida a partir da DA sob a ação da enzima β -hidroxilase; a NA pode atuar como um hormônio liberado pelas adrenais na corrente sanguínea e atuar como um neurotransmissor no SNC (TULLY; BOLSHAKOV, 2010). A NA é sintetizada principalmente em neurônios no *locus coeruleus*, e em menor extensão em áreas tegumentares laterais (SMYTHIES, 2005; SCHWARZ; LUO, 2015). Estudos realizados em camundongos geneticamente modificados, sem o gene da dopamina β -hidroxilase, mostraram que a administração NA é fundamental para a aquisição da memória espacial de

trabalho, evidenciando principalmente a participação dos receptores α_2 -adrenérgico no processo desse tipo de memória (GERTNER; THOMAS, 2006). Além disso, a NA, via receptores adrenérgicos, ativa a adenilato ciclase, a proteína quinase dependente de AMPc (LEDOUX, 2000; MAREN, 2001; HALL, 2004) e a CaMK II (WANG et al., 2004), eventos associados a potenciação de longa duração. Sabe-se ainda, que receptores β -adrenérgicos participam da indução do processo de potenciação de longa duração (WATABE; ZAKI; O'DELL, 2000; GELINAS; NGUYEN, 2005). Ressalta-se também que, a NA pode modular receptores AMPA de glutamato para sítios sinápticos (HU et al., 2007), bem como permitir a indução da potenciação de longa duração do tálamo para a amígdala lateral, através da supressão da neurotransmissão GABAérgica (TULLY; BOLSHAKOV, 2010). No que diz respeito ao processo de envelhecimento, um estudo realizado em ratos com 5 e 24 meses de idade, mostrou redução da neurotransmissão noradrenérgica no córtex cingulado e prejuízo da memória espacial em ratos idosos (COLLIER et al., 2004). Mais recentemente, um estudo em camundongos, mostrou diminuição plasmática de catecolaminas com o avanço da idade no entanto, não se avaliou a função cognitiva (AMANO et al., 2013). Ressalta-se que, estudos em modelos animais, sugerem que a deficiência de NA relacionada com a idade contribui para o prejuízo cognitivo observado durante o envelhecimento normal, bem como na Doença de Alzheimer (FRANCIS et al., 2012; MEI et al., 2015).

A 5-HT é uma indolamina que apresenta distintas funções, como modular a motilidade gastrointestinal, o tônus vascular periférico e central, bem como regular a temperatura corpórea, o apetite, o sono, o comportamento sexual, além de estar associada às desordens de humor (MOHAMMAD-ZADEH; MOSES; GWALTNEY-BRANT, 2008). A maior parte da 5-HT é sintetizada no trato gastrintestinal, principalmente nas células enterocromafins, e apenas uma pequena quantidade é produzida dentro do SNC, por neurônios que, em sua maioria, se localizam na formação reticular do tronco encefálico, denominados núcleos da rafe (LESURTEL et al., 2008; BERTRAND; BERTRAND, 2010).

Com relação ao processo de envelhecimento, sabe-se que a 5-HT, bem como fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) diminuem com o aumento da idade e podem estar implicados na regulação da plasticidade sináptica e na neurogênese no indivíduo adulto (MATTSON; MAUDSLEY; MARTIN, 2004).

Vale a pena comentar que, o BDNF desempenha distintas funções, uma vez que está relacionado ao processo de aprendizagem e memória, locomoção, respostas ao estresse e comportamentos afetivos (RUSSO-NEUSTADT, 2003; LU; CHRISTIAN; LU, 2008; AUTRY; MONTEGGIA, 2012). O envelhecimento normal parece estar associado com a diminuição da capacidade de sinalização do BDNF e, conseqüentemente, diminuição das suas funções (MATTSON; MAUDSLEY; MARTIN, 2004). Considerando a 5-HT, estudos mostraram que a monoamina oxidase A (MAO-A), enzima que degrada esse neurotransmissor, aumenta com a idade, o que pode gerar radicais livres (RL) a partir de reações que excedem as reservas de antioxidantes naturais (VOLCHEGORSKII et al., 2004), contribuindo para o dano neuronal.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e desempenha importante papel nas funções motora, cognitiva e emocional, as quais são afetadas no decorrer do envelhecimento natural (SEGOVIA et al., 2001). O glutamato é encontrado principalmente em neurônios e astrócitos (MARSMAN; MANDL; et al., 2013), enquanto a glutamina, o seu precursor, é encontrado predominantemente nas células da glia (MARTINEZ-HERNANDEZ; BELL; NOREMBERG, 1977). Dessa forma, o glutamato tem sido utilizado para avaliar a integridade neuronal, bem como a glutamina tem sido utilizada para avaliar mudanças nas células da glia durante o envelhecimento normal (KAISER et al., 2005).

As funções do glutamato se devem a sua atuação em receptores ionotrópicos e metabotrópicos, destacando-se a importância dos receptores ionotrópicos, principalmente do tipo NMDA que participam diretamente no processo de aprendizado e memória (SEGOVIA et al. 2001). Sabe-se que aproximadamente 90% dos neurônios do hipocampo são glutamatérgicos, enquanto somente 10% são de natureza inibitória, ou seja, GABAérgicos (RISSMAN; MOBLEY, 2011). As alterações no metabolismo do glutamato ou na sua neurotransmissão podem contribuir para a diminuição de mecanismos neurais subjacentes que estão relacionados a funções comportamentais oriundas dos sistemas eferentes corticais (ZAHR et al., 2008). Estudos realizados em indivíduos jovens e idosos mostraram que a diminuição do glutamato em diferentes regiões encefálicas como, no córtex motor, em áreas sensoriais e no hipocampo está diretamente relacionada com o aumento da

idade (KAISER et al., 2005; RAININKO; MATTSSON, 2010). Mais recentemente, Marsman et al. (2013), mostraram que a diminuição do glutamato em indivíduos jovens adultos ocorreu devido a mudanças fisiológicas e não anatômicas do encéfalo, como por exemplo, redução de volume. Ressalta-se, ainda, que a expressão do transportador de glutamato do tipo EAAT1 parece diminuir com a idade, sendo essa diminuição mais evidente na doença de Alzheimer (SHELDON; ROBINSON, 2007).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC; alguns estudos em roedores e em macacos mostraram mudanças relacionadas à idade no que diz respeito ao número total, ligação e afinidade dos receptores GABA_A (PEDIGO et al., 1981; RUANO et al., 1995; RISSMAN et al., 2006). Ressalte-se que a formação do GABA ocorre através da descarboxilação do glutamato, por meio da enzima glutamato descarboxilase (Figura 1.3).

Figura 1.3. Síntese do ácido gama-aminobutírico (GABA) a partir do glutamato.

Fonte: Sandini (2017).

No que diz respeito ao GABA e ao processo de senescência, um estudo mostrou que no CPF de macaco Rhesus e no de seres humanos, muitos genes que estão envolvidos na neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA são regulados negativamente com o aumento da idade, alterando o equilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória (LOERCH et al., 2008). Esse desequilíbrio pode aumentar a atividade neuronal no CPF de indivíduos idosos, sendo inicialmente um mecanismo compensatório, porém com o passar do tempo, pode ocorrer uma excitotoxicidade e ser um “gatilho” para o surgimento de doenças neurodegenerativas (BISHOP; LU; YANKNER, 2010). Além disso, com o envelhecimento há diminuição da atividade da enzima glutamato

descarboxilase, que é responsável pela síntese de GABA, principalmente no tálamo (PARENTE, 2006).

A Ach é um neurotransmissor da classe das aminas, que apresenta papel importante na função cognitiva, principalmente na consolidação da memória. No processo de envelhecimento normal, tem-se observado declínio progressivo da atividade da enzima colina acetiltransferase, responsável pela síntese de Ach, bem como diminuição de receptores muscarínicos e nicotínicos (BARNES et al., 2000; ZHANG, 2004). A redução dos níveis de Ach pode ser observado em regiões do córtex frontotemporal e do hipocampo (PARENTE, 2006). A atividade da acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada a Ach, é diminuída na presença de RL, bem como no estresse oxidativo (MOLOCHKINA et al., 2005) e também na peroxidação lipídica (JHA; RIZVI, 2009) todos eventos que ocorrem no envelhecimento.

1.1.4 Ácidos graxos, memória e senescência

O encefálo é rico em lipídeos, sendo que mais da metade do peso seco deste órgão é composto principalmente por ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (GUINÉ; HENRIQUES, 2011; WEISER; BUTT; MOHAJERI, 2016). Os PUFAs podem desempenhar importantes funções na manutenção e permeabilidade de membranas, na transdução de sinais, na ativação de fatores de transcrição (SPECTOR, 1999) bem como no desenvolvimento, maturação e funcionamento do SNC (WALL et al., 2014; WEISER; BUTT; MOHAJERI, 2016).

O ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) e o ácido araquidônico (AA, 20:4n-6) são os principais PUFAs encontrados no SNC (SINGH, 2005), sendo que o DHA é o mais abundante (WEISER; BUTT; MOHAJERI, 2016). O DHA é encontrado principalmente na substância cinzenta, na retina (KIM, 2007) e, em menores concentrações, no coração e esperma (PICQ et al., 2010). Além disso, também está presente nas membranas estruturais encontradas nos terminais sinápticos, mitocôndrias e retículo endoplasmático (SUZUKI et al., 1997). Dessa forma, o DHA pode afetar características celulares e processos fisiológicos que incluem a fluidez da membrana, função de receptor transmembrana, expressão de genes, transdução de sinal, mielinização, diferenciação e crescimento

neuronal (WEISER; BUTT; MOHAJERI, 2016). No encéfalo, o AA e seus metabolitos podem influenciar na transdução de sinal, transcrição gênica, atividade neuronal, apoptose (LESLIE ; WATKINS, 1985; KAM; SEE, 2000) e liberação de neurotransmissores (OJEDA et al., 1989).

O DHA e o AA são convertidos pela acil-CoA-sintetase em acil-CoAs e são esterificados em glicerofosfolídeos na posição sn-2 via acetil-CoA transferase (LUCHTMAN; SONG, 2013). O DHA é armazenado principalmente na forma de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina em membrana fosfolipídicas, e em quantidades menores pode ser encontrado em fosfatidilcolina (RAPOPORT, 1999).

Os efeitos dos ácidos graxos sob a função celular e neuronal são complexos e incluem: 1) modulação estrutural e funcional de lipídeos e de membranas neuronais, incorporadas a proteínas e receptores de sinalização; 2) podem agir como ligantes diretos a fatores de transcrição e atuar em diversos processos, como metabolismo, neurogênese, sinaptogênese, diferenciação, inflamação e estresse oxidativo; 3) agir como precursores na biossíntese de lipídeos que estão envolvidos na regulação de muitas repostas celulares e teciduais (LUCHTMAN; SONG, 2013). Devido a esses diferentes mecanismos de ação, o DHA apresenta diversas funções como no funcionamento da memória via modulação glutamatérgica por meio da potenciação de longa duração (DENIS et al., 2013), na função excitável da membrana (MCGAHON et al., 1999), na biogênese e função de células fotorreceptoras (GORDON; BAZAN, 1990), na sinalização neuronal e na neuroproteção (AKBAR et al., 2005; BAZAN, 2007). O AA também parece modular a potenciação de longa duração, contribuindo no processo de transmissão sináptica e plasticidade (ANGELOVA; MÜLLER2009).

Com relação à memória, estudos em modelos animais tem evidenciado melhora da performance cognitiva após a suplementação com ácidos graxos n-3, especialmente com DHA e ácido eicosapentaenoico (EPA) (HASHIMOTO et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2015). Além disso, outros trabalhos mostraram correlação entre a melhora da capacidade cognitiva juntamente com a restauração da plasticidade sináptica no hipocampo de roedores (MARTIN et al., 2002; LYNCH et al., 2007; KELLY et al., 2011). Ressalta-se, ainda, que em modelos de animais transgênicos com a Doença de Alzheimer, a administração de DHA reduziu significativamente a deposição da placa β -amiloide, bem como

da proteína TAU, através da sinalização de moléculas pós-sinápticas e inibição da presenilina 1 (LIM et al., 2005; GREEN et al., 2007).

Estudos experimentais em roedores tem demonstrado que a suplementação com AA exerce efeitos positivos sobre a cognição e a plasticidade sináptica durante o envelhecimento. Nesse sentido, a suplementação diária com 10 mg de AA durante 8 semanas foi capaz de restaurar a diminuição de AA no hipocampo, bem como a potenciação de longa duração em ratos com 22 meses de idade (MCGAHON; CLEMENTS; LYNCH, 1997). Resultados similares foram encontrados em ratos idosos (2 anos de idade), quando comparado com ratos jovens (2 meses de idade), além disso, nesse estudo, houve correlação entre a melhora da memória espacial e a concentração de AA no hipocampo (KOTANI et al., 2003). O efeito do AA sob a função sináptica pode ser decorrente do AA livre produzido pelos neurônios pós-sinápticos que age como um mensageiro retrogrado e aumenta a liberação de neurotransmissores pelos neurônios pré-sinápticos (NISHIZAKI et al., 1999). Acredita-se ainda, que o AA pode agir inibindo a recaptação dos neurotransmissores pelas vesículas sinápticas (ROSETH; FYKSE; FONNUM, 1998), dessa forma estimulando a potenciação de longa duração e consequentemente amplificando a transmissão sináptica (THOMAS et al., 2016). Contudo, estudos adicionais são importantes para compreender o metabolismo e os efeitos do AA no SNC, uma vez que o envelhecimento bem como o acúmulo da proteína β -amilóide e outros fatores fisiológicos podem modificar os efeitos do AA na sinapse e nas células neuronais (THOMAS et al., 2016).

Considerando os níveis dos ácidos graxos em seres humanos, um estudo mostrou que vários PUFAs diminuem com a idade, principalmente o AA no córtex frontal. Ainda, nesse mesmo estudo, verificou-se que os níveis de DHA aumentam consideravelmente com a idade; no entanto, isso acontece apenas nas duas primeiras décadas de vida, ocorrendo posteriormente uma queda dos níveis deste ácido graxo (CARVER et al., 2001). Por esse motivo, recomenda-se a ingestão de fontes ricas em DHA, que incluem óleos de linhaça, canola, algas e peixes (salmão, cavala, sardinha e arenque), nozes e sementes de gergelim (RUSSO, 2009; WEISER; BUTT; MOHAJERI, 2016). O AA pode ser proveniente via exógena a partir do seu precursor, o ácido linoleico por meio da

atividade das enzimas elongases e desaturases, e por via endógena, encontrado principalmente em ovos, carne e peixes (CALDER, 2007).

Com relação ao consumo de DHA em indivíduos idosos saudáveis, um estudo mostrou que a suplementação diária com 900 mg de DHA durante 6 meses foi capaz de melhorar o aprendizado, bem como a memória episódica além de prevenir doenças cardiovasculares (YURKO-MAURO et al., 2009). Mais recentemente, um estudo mostrou que 100 mg por dia de fosfatidilserina enriquecida com DHA, apresentou melhora da resposta cognitiva em idosos que apresentavam queixas de memória (VAKHAPOVA et al., 2014). A suplementação durante 6 meses com ácidos n-3 (DHA e EPA) em indivíduos idosos com prejuízo cognitivo leve e depressão, foi capaz de melhorar a saúde física associada ao aumento dos níveis de DHA; por outro lado, não houveram diferenças nos parâmetros cognitivos avaliados (SINN et al., 2012). Porém, outro estudo realizado durante 26 semanas com altas doses de DHA e EPA (880 mg de DHA e 1320 mg EPA) em idosos saudáveis (50 - 75 anos de idade), mostrou que esta associação foi capaz de melhorar a integridade da substância branca, o volume da substância cinzenta, bem como as funções executivas destes indivíduos (WITTE et al., 2013). Ainda, a suplementação de AA e DHA (240 mg/dia) durante 90 dias, foi capaz de melhorar o prejuízo cognitivo observado em pacientes idosos e com danos encefálicos orgânicos, no entanto, não houve melhora em pacientes com doença de Alzheimer (KOTANI et al., 2006).

Vale a pena comentar que em idosos saudáveis e com a Doença de Alzheimer, verificou-se diminuição das concentrações encefálicas de DHA (SÖDERBERG et al., 1991), bem como das concentrações de AA no córtex temporal de pacientes com a Doença de Alzheimer (FRASER; TAYLER; LOVE, 2010). Estudos apontam que o volume da substância cinzenta diminui com a idade e, conseqüentemente, ocorre redução dos níveis de DHA (RESNICK et al., 2003; MCNAMARA et al., 2008). A diminuição do DHA em indivíduos idosos pode ser, em parte, devido a mudanças nas atividades das enzimas responsáveis pela hidrólise do DHA esterificado em fosfolípidios (GIUSTO et al., 2002; ANDRÉ et al., 2006) ou mudanças na farmacocinética plasmática do DHA (PLOURDE et al., 2011). Com relação ao AA, sabe-se que na Doença de

Alzheimer há alterações na cascata desse ácido graxo, evidenciada pelo aumento das enzimas fosfolipase citosólica (cPLA₂) e fosfolipase secretória (sPLA₂), bem como aumento de marcadores neuroinflamatórios (RAO; RAPOPORT; KIM, 2011). No entanto, em indivíduos idosos saudáveis não houve diferenças em ambas enzimas (cPLA₂ e sPLA₂) no córtex frontal (KELESHIAN et al., 2013). Contudo, estudos que avaliem os hidróxidos do ácido araquidônico (HETE) e sua possível relação com o prejuízo cognitivo associado ao envelhecimento ainda são escassos.

Ressalta-se, ainda, que no envelhecimento ocorre aumento da geração de RL, bem como do estresse oxidativo que acarreta em uma série de alterações no DNA, nas proteínas e na peroxidação lipídica (AKILA et al., 2007; GOTO; RADAK, 2013; CARMEN; EVA; MONICA DE LA, 2014). A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos PUFAs das membranas celulares, gerando RL que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas. Nesse sentido, o DHA bem como o AA, são altamente susceptíveis à peroxidação lipídica e, conseqüentemente, ao surgimento de radicais de oxigênio (DAS et al., 1987; ROIG-PÉREZ et al., 2004).

A lipoperoxidação nos sistemas biológicos pode ocorrer principalmente por duas vias: uma via não enzimática, que envolve a participação de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS) e metais de transição (CHENG; LI, 2007), e uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases (LIMA; ABDALLA, 2001; YIN; XU; PORTER, 2011). Além disso, a cascata enzimática de oxidação do AA e do DHA também pode ocorrer através das enzimas do citocromo P450, que catalisam hidróxidos e epóxidos (CAPDEVILA; FALCK; HARRIS, 2000; PHILLIS; HORROCKS; FAROOQUI, 2006; MULUGETA et al., 2010).

Sabe-se que a oxidação enzimática dos PUFAs está relacionada com a produção de mediadores específicos com atividade anti-inflamatória, como as resolvinas, protectinas e maresinas, além das lipoxinas provenientes especificamente do AA (SERHAN et al., 2002; KASUGA et al., 2008), enquanto a oxidação não enzimática gera produtos deletérios para as células, como os hidroperóxidos e outros compostos ainda pouco estudados (GIROTTI, 1998; APPOLINÁRIO et al., 2011). Os hidroperóxidos de lipídios são produtos primários da peroxidação lipídica, instáveis e que podem sofrer reações de

oxidação não enzimática sucessivas formando diferentes compostos como: aldeídos, neuroprostanos (oxidação do DHA) ou isoprostanos (oxidação do AA), neurofuranos (oxidação do DHA) ou isofuranos (oxidação do AA), alcanos e mono ou dihidroxi-ácidos graxos (SMITH; MURPHY, 2008). Nesse sentido, a identificação dos hidroperóxidos/hidróxidos dos PUFAs formados por via enzimática ou não enzimática, tem ganhado destaque, uma vez que estão relacionados ao surgimento de doenças neurodegenerativas, bem como o envolvimento nas mudanças que ocorrem durante o processo de senescência.

OBJETIVOS

1.2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da idade nos aspectos comportamental, neuroquímico e de ácidos graxos em ratas jovens (3 meses de idade), de meia-idade (12 meses de idade) e senescentes (18 meses de idade).

1.2.1 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da idade sobre:

- a atividade motora em campo aberto;
- o comportamento tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado e na caixa claro-escuro;
- a memória tipo episódica no teste de reconhecimento de objetos, bem como a memória espacial no labirinto Barnes;
- o nível sérico de estradiol;
- os níveis de neurotransmissores e seus metabólitos em diferentes regiões encefálicas;
- os níveis de hidróxidos do ácido docosahexaenoico, do ácido araquidônico, do ácido linoleico e do ácido oleico no córtex pré-frontal;

MATERIAL E MÉTODOS

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Animais

Foram utilizadas ratas *Wistar*, com 3 (jovens), 12 (meia-idade) e 18 (senescentes) meses de idade, provenientes do biotério do Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), Campus de Pirassununga. Os animais foram alojados em caixas de plástico fosco com tampas metálicas, medindo 40x50x20 cm, as quais foram mantidas em salas com temperatura e umidade constantes (21-24°C e 65-70%, respectivamente), em ciclo de luz claro/escuro de 12 h, sendo a luz acessa às 6 h. Durante toda a análise comportamental, os animais receberam água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as normas de manipulação animal adotadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP, sob protocolo nº 3047/2013 (Anexo 1).

1.3.2 Avaliação comportamental

1.3.2.1 Avaliação da atividade geral no campo aberto (CA)

O campo aberto é um teste padrão para avaliar comportamento exploratório e a ansiedade em roedores (ARCHER, 1973). O CA consiste de uma arena circular de madeira (diâmetro de 90 cm circundada por uma parede com 27 cm de altura), pintada de preto fosco (Fig. 1.4A).

Cada rata foi colocada individualmente no centro do CA, sendo filmada em sessões de cinco minutos. Posteriormente, cada filmagem foi avaliada pelo programa de análises comportamentais *Ethovision*® (*Ethovision*; Noldus Information Technology, Leesburg, VA), no qual foram obtidos os parâmetros da distância total percorrida (cm), frequência e tempo (s) na zona central,

intermediária e periférica da arena (Fig.1.4B), bem como a velocidade média percorrida (cm/s). A frequência de exploração vertical (levantar) e a frequência da autolimpeza (*grooming*) foram feitos por intermédio de contador manual. Além disso, ao término do experimento contou-se o número de bolos fecais. Todas as sessões foram conduzidas no período da manhã, sob luz ambiente de média intensidade do laboratório de comportamento. Entre um animal e outro, o aparato foi limpo com solução de álcool a 5% para evitar a interferência do odor do animal anterior.

Figura 1.4. Campo aberto

Legenda: A) Arena de campo aberto utilizada para avaliar atividade motora. B) Ilustração da divisão das zonas (central, intermediária e periférica) que foram analisadas pelo *Ethovision*®

Fonte: Sandini (2017).

1.3.2.2 Avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado é um modelo comportamental amplamente empregado para avaliar o efeito ansiolítico ou ansiogênico de novos fármacos (PELLOW et al., 1985; DAWSON; TRICKLEBANK, 1995). Este equipamento é constituído de uma estrutura de madeira pintada de cor preta fosca, em forma de cruz, com dois braços abertos (50x10 cm) e dois braços fechados (50x10x40 cm) conectados por uma plataforma central (10x10 cm) e elevado a 55 cm do chão (Fig. 1.5).

Cada animal foi colocado, individualmente, no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e, durante 5 min, observaram-se os seguintes parâmetros: frequência de avaliação de risco (quando o animal

explora o espaço vazio dos braços abertos do labirinto), frequência do comportamento de autolimpeza (*grooming*), frequência de levantar e frequência de *head dipping* (projeções da cabeça do animal para fora e para baixo do aparato, para explorar o ambiente a sua volta). Além disso, calculou-se a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) e porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA), como mostrado a seguir:

$$\% \text{ EBA} = \text{EBA} \times 100 / \text{EBA} + \text{EBF} \text{ (entrada braços fechados)}$$

$$\% \text{ TBA} = \text{TBA} \times 100 / \text{TBA} + \text{TBF} \text{ (tempo braços fechados)}$$

Todas as sessões foram conduzidas no período da manhã, sob luz ambiente de média intensidade do laboratório de comportamento. Entre as observações de cada animal, o labirinto foi limpo com solução de álcool 5%. Posteriormente, os parâmetros descritos acima foram avaliados com o auxílio do programa de análises comportamentais Etholog 2.2 (OTTONI, 2000).

Figura 1.5. Labirinto em cruz elevado

Legenda: BF = braço fechado, BA = braço aberto

Fonte: Sandini (2017).

1.3.2.3 Avaliação do comportamento na caixa claro-escuro (CCE)

A CCE consiste de uma caixa de acrílico com dois compartimentos, sendo um escuro e pequeno (21,5x34,5 cm), e outro claro e maior (21,5x43,6 cm), o qual possui um foco de luz (lâmpada de 60 watts). Os compartimentos são separados por uma porta por onde as ratas podem atravessar (Fig. 1.6). Nesse teste, o compartimento claro funciona como um estímulo ansiogênico, no qual

há um conflito entre a motivação de explorar e a de evitar o ambiente claro, que contem, adicionalmente, o estímulo aversivo (fonte de luz).

Cada rata foi colocada individualmente no compartimento claro, com a cabeça voltada em direção oposta à porta, e durante cinco minutos avaliou-se: latência (s) para entrar no compartimento escuro, tempo (s) e o número de passagem em ambos os compartimentos, bem como o número total de cruzamento. Para avaliar o tempo em cada compartimento utilizou-se um cronômetro digital.

Todas as sessões foram conduzidas no período da manhã, sob luz ambiente de média intensidade do laboratório de comportamento. Entre um animal e outro, para evitar a interferência do odor do animal anterior, o aparato foi limpo com solução de álcool a 5%.

Figura 1.6. Caixa claro-escuro.

Legenda: A) Caixa claro-escuro utilizada para avaliar o comportamento tipo-ansioso. B) Caixa claro-escuro com fonte de luz no compartimento claro.

Fonte: Sandini (2017).

1.3.2.4 Avaliação da memória episódica no teste de Reconhecimento de Objetos (RO)

O teste de reconhecimento de objeto (RO) avalia simultaneamente os aspectos “o quê”, “quando” e “onde” da memória episódica (que se refere a acontecimentos específicos), aproveitando-se da exploração natural dos

roedores pela novidade (DIX; AGGLETON, 1999; ENNACEUR et al., 2005; DERE et al., 2006).

Esse teste foi realizado na arena do campo aberto e o protocolo consistiu de três fases distintas: fase de habituação, fase de familiarização e o teste propriamente dito. Na fase de habituação (primeiro dia), o animal foi colocado no centro do campo aberto e permitiu-se a exploração da arena durante 5 minutos. No segundo dia, fase de familiarização (ou de aquisição), o animal foi colocado novamente na arena do campo aberto, porém, desta vez, na presença de dois objetos idênticos para a livre exploração durante 5 minutos. No terceiro dia, consistiu-se a sessão teste, quando o animal foi colocado novamente na arena do campo aberto, porém um dos objetos familiares foi substituído por um objeto novo (não familiar), permitindo livre acesso a exploração dos objetos durante 5 minutos (Fig. 1.7). Neste dia a exploração dos objetos foi avaliada através do comportamento investigativo do animal (farejar ou tocar os objetos), considerando o tempo total de exploração do objeto familiar (OF) e do objeto novo (ON) por meio de um cronômetro digital. Com esses dados foram calculados o índice de discriminação (ID) e o índice de preferência (IP).

O ID permite verificar a discriminação entre o OF e o ON, sendo calculado a diferença entre o tempo gasto com o objeto novo e o familiar e, em seguida, este valor foi dividido pelo tempo total de exploração em ambos objetos [$ID = (T_{\text{tempoON}} - T_{\text{tempoOF}} / T_{\text{tempoON}} + T_{\text{tempoOF}})$]. Este resultado pode variar entre +1 e -1, sendo que um escore positivo indica mais tempo gasto com o objeto novo e um escore negativo indica mais tempo gasto com o objeto familiar, enquanto um escore zero indica preferência nula (AGGLETON et al., 2010).

O IP foi calculado considerando a seguinte fórmula: $(T_{\text{tempoON}} / T_{\text{tempoON}} + T_{\text{tempoOF}}) \times 100$. Assim, um IP acima de 50% indica preferência pelo ON e um IP abaixo de 50% indica preferência pelo OF, enquanto um IP de 50% indica preferência nula (HAMMOND; TULL; STACKMAN, 2004; WANG et al., 2006).

Todas as sessões foram conduzidas no período da tarde (13h-15h), sob luz ambiente de média intensidade do laboratório de comportamento. Entre um animal e outro, para evitar a interferência do odor do animal anterior, o aparato e os objetos foram limpos com solução de álcool 5%.

Figura 1.7. Ilustração do protocolo utilizado no teste de reconhecimento de objetos.

Fonte: Sandini (2017).

1.3.2.5 Avaliação da memória espacial no labirinto de Barnes (LB)

O LB é amplamente utilizado para avaliar a memória espacial de longo prazo. O aparato empregado consiste de uma plataforma circular branca, com 120 cm de diâmetro, colocada a 90 cm do chão, que apresenta 18 orifícios de 9 cm de diâmetro, equidistantes entre si, distribuídos por toda sua borda (Fig. 1.8A). Sob um dos orifícios há uma caixa de escape (CE) contendo maravalha. O aparato permanece sob luz ambiente de média intensidade da sala de experimentação que continha figuras geométricas nas paredes, como dicas visuais distais para a orientação dos animais. Nesse caso, avaliou-se a memória de referência espacial das ratas, pois a CE e as pistas visuais foram mantidas em uma única localização durante todo o experimento (Fig. 1.8B).

Primeiramente, a rata foi colocada no centro do aparato, sendo mantida por 30 s sob uma caixa de retenção retangular de isopor (29x18x13 cm), a fim de que permanecesse confortável e com a face voltada, aleatoriamente, para qualquer um dos orifícios do LB. Após esse período, a caixa de retenção foi removida, possibilitando a exploração do ambiente pela rata, durante 5 min, com a finalidade de encontrar a CE. Caso o animal não adentrasse na CE no tempo limite de 5 min, o experimentador o conduzia gentilmente até a CE, sendo mantido neste local por 30 s para, então, retornar a sua gaiola moradia. Quando o animal adentrasse na CE antes deste tempo limite, foi permitido que ele permanecesse lá por 30 s, para depois ser retirado e recolocado em sua gaiola moradia. Os parâmetros analisados foram: a latência (s) para o animal entrar na

CE (com as quatro patas) e número de erros (quando a rata coloca seu focinho em um orifício sem CE). A latência foi avaliada por meio de cronômetro digital.

O experimento foi conduzido em cinco dias, sendo quatro dias de treino composto de duas sessões diárias de 5 min cada uma (manhã e tarde), sendo no quinto dia realizado o teste pela manhã. A cada sessão, a plataforma foi limpa com álcool 70% e a maravalha da CE trocada.

Figura 1.8. Ilustração do labirinto de Barnes

Legenda: A) Aparato utilizado para avaliar a memória espacial. B) Ilustração das pistas visuais (figuras geométricas) para avaliar a memória de referência espacial.

Fonte: Sandini (2017).

1.3.3 Análise sérica de estradiol

Os níveis séricos de estradiol foram determinados pela técnica de ensaio imuno-enzimático de duplo-anticorpo competitivo, empregando-se kits comerciais apropriados (Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, EUA, catálogo nº 582251). As amostras foram diluídas 2x, 5x, 10x, 30x e 60x para verificar qual fator de diluição que melhor se enquadrava à curva padrão do kit; a diluição escolhida foi de 60x. Os demais procedimentos foram realizados de acordo com os descritos pelo fabricante.

1.3.4 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos

Para essa avaliação foram coletadas quatro estruturas do encéfalo: hipotálamo, CPF, hipocampo e estriado, sendo então preparadas e posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

1.3.4.1 Colheita das estruturas encefálicas e preparo das amostras

Os animais foram decapitados com auxílio de uma guilhotina e o encéfalo foi rapidamente retirado, sobre uma placa de gelo, com a finalidade de preservar a retirada das diferentes estruturas encefálicas. Esse procedimento nunca ultrapassou o tempo máximo de 3 minutos por encéfalo. As amostras foram acondicionadas em *eppendorfs* e rapidamente colocadas em gelo seco, sendo a seguir pesadas e estocadas, por até 30 dias, em freezer -80°.

Posteriormente, as estruturas encefálicas coletadas foram homogeneizadas, com solução de ácido perclórico (ClHO_4) 0,1 M (Merck®) contendo 0,02% de metabissulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA (ácido 3,4-dihidroxibenzilamina - padrão interno para a avaliação dos neurotransmissores), com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência, sendo o volume de ácido de 15 vezes o peso do córtex pré-frontal, o hipotálamo e o hipocampo, e de 20 vezes para o estriado.

Após a homogeneização, as estruturas foram deixadas *overnight* em refrigerador a 10°C para precipitação das proteínas e ácidos nucleicos. Na manhã seguinte, o material foi centrifugado a 10.000 rpm (centrífuga Harrier 18/80 MSE da Sanyo® - refrigerada a 4°C), por um período de 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e colocado em *eppendorfs* para ser armazenado em freezer -80°C, para posterior quantificação dos neurotransmissores e respectivos metabólitos através de HPLC, como descrito previamente (FELICIO et al., 1996). Foram quantificados:

- Dopamina (DA) e seus metabólitos, ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA);
- Serotonina (5HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA);
- Noradrenalina (NA) e seu metabólito ácido vanil-mandélico (VMA);

- Aminoácidos neurotransmissores: glutamato e GABA.

Além disso, a avaliação da taxa de renovação dos neurotransmissores (*turnover*) foi calculada através da razão neurotransmissor/metabólito para cada um dos neurotransmissores quantificados.

1.3.4.2 Análise das monoaminas por HPLC-ED e dos aminoácidos por UFLC

As análises das monoaminas (DA, 5-HT e NA) e seus metabólitos foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ED) no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, como descrita por Felicio et al. (1996). Para tanto foi empregado o cromatógrafo Shimadzu Modelo 20A, composto por um injetor automático com válvula injetora de volume variável (entre 1 e 100 μ l), bombas de fluxo quaternárias, uma coluna cromatográfica (150 x 4,6 mm, Shimpak – ODS C 18) com filtro de linha e um detector eletroquímico Antec Decade. Foi utilizada a técnica de cromatografia em fase reserva com pareamento iônico, que é baseada na cromatografia de partição ou absorção. Para as análises foi utilizada a temperatura de 50°C e o tempo de obtenção dos picos foi de até 24 minutos.

A fase móvel utilizada foi um sistema isocrático formado por tampão citrato 0,02 M, metanol 92:8 (v/v), 0,12 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico (HSA). O pH foi ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico (H_3PO_4). A fase móvel foi filtrada em um sistema à vácuo antes de ser utilizada no HPLC-ED. Após esse procedimento ela circulou no sistema *overnight* para equilíbrio da coluna, que operou em um fluxo de 1 ml/min. O detector foi mantido com um potencial de 0,8 V no eletrodo de trabalho.

Para o preparo das soluções padrões das monoaminas foi utilizado padrões de concentrações 1 mM de cada neurotransmissor e seu metabólito diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e estocados em freezer -80°C por um período de até 2 meses. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos de 2.500 a 10.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M. Foram injetados pelo menos dois padrões no HPLC-ED

diariamente, um antes e outro ao final das dosagens para a utilização dos valores como referência.

O equipamento foi padronizado diariamente, no início e no término da quantificação, com uma solução de trabalho, com concentração conhecida, de neurotransmissores, seus metabólitos e DHBA, empregando-se como diluente uma solução de ácido perclórico, 0,1M, contendo EDTA e metabissulfito de sódio.

Os neurotransmissores e seus metabólitos foram reconhecidos a partir do seu tempo de retenção na coluna cromatográfica comparando-as com os padrões (Fig.1.9), enquanto a determinação da concentração dos mesmos foi realizada utilizando-se o valor da área do pico na equação obtida para a curva de calibração. O limite de detecção para todos os analitos variou entre 0,25 e 1 ng, o limite de quantificação foi de 10 ng/g de tecido encefálico ou 1,0 ng por 60 ng de sobrenadantes e a taxa de recuperação foi superior a 80%.

As análises dos aminoácidos GABA e glutamato, foram feitas em colaboração com o Professor Doutor Ivo Lebrun do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

As amostras foram analisadas utilizando cromatografia líquida ultra rápida (UFLC – Shimadzu), com uma coluna C18, fase reversa (ACE 3 C18-300®, 150 x 3.0 mm), acoplado a um detector PDA (*photo diodo array*), ajustado no comprimento de onda de 254 nm. Como fase móvel A foi utilizada uma solução tampão com 6% de acetonitrila, e a fase B composta por 80% acetonitrila, 20% água milli-Q e 0,02% EDTA. A corrida analítica foi realizada em 46 minutos, em fluxo 0,3 mL/min na proporção de 94% de fase móvel A e 6% de fase móvel B. Os resultados da análise foram obtidos através de comparação com a curva de calibração obtida na análise do padrão (Fig.1.10). O limite de detecção para o GABA foi de 20 pg.

Figura 1.9. Cromatograma demonstrando os picos correspondentes à análise obtida das monoaminas (NOR, DA e 5-HT) e de seus metabólitos (VMA, DOPAC, 5HIAA e HVA).

Legenda: ácido vanil-mandélico (VMA), noradrenalina (NOR), ácido 3,4 dihidroxibenzilamina (DHBA), ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC), dopamina (DA), ácido 5-hidroindolacético (5HIAA), serotonina (5HT) e ácido homo-vanílico (HVA).

Fonte: Sandini (2017).

Figura 1.10. Cromatograma demonstrando os picos correspondentes à análise obtida dos aminoácidos (glutamato e ácido gama aminobutírico - GABA).

Fonte: Sandini (2017).

1.3.5 Metodologia para extração lipídica para análise de oxi-lipidômica

A análise dos níveis dos hidróxidos (HDoHE) do ácido docosahexaenóico (DHA), dos hidróxidos (HETE) do ácido araquidônico (AA), dos hidróxidos

(HODE) do ácido linoleico (LA) e dos hidróxidos (HOA) do ácido oleico, foram realizadas em colaboração com a Prof. Dra. Sayuri Miyamoto e o aluno de doutorado Adriano de Britto Chaves Filho, do Instituto de Química, Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo.

Para a extração lipídica e posterior análise de oxi-lipidômica dos hidróxidos dos ácidos graxos acima, o córtex pré-frontal de ratas Wistar foram coletados e homogeneizados em tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,4) contendo desferroxamina 100 μ M com auxílio de homogeneizador do tipo potter. A seguir, os homogenatos foram preparados na concentração de 50 mg/mL.

O método de extração em fase líquida utilizado no presente estudo foi baseado em métodos previamente descritos (YOSHIDA et al., 2008; LEVISON et al., 2013). Sendo assim, após o preparo dos homogenatos, 320 μ L de cada homogenato (16 mg) foi adicionado à 500 μ L de uma solução contendo BHT 100 μ M e 5-HETE-d8 250 ng/mL em metanol. Em seguida, a mistura inicial foi adicionada de 1,5 mL de uma solução contendo clorofórmio/acetato de etila (4:1) e submetida à agitação em vórtex (30 s) e à centrifugação por 2 min à 1500 x g, à 4 °C. Posteriormente, a fase orgânica foi coletada e o processo de extração foi repetido com adição de mais 1,5 mL de uma solução contendo clorofórmio/acetato de etila (4:1). As fases orgânicas foram combinadas, evaporadas sob fluxo de nitrogênio e, então, ressuspensas em 1 mL de isopropanol. Para extração dos produtos de oxidação que se encontravam esterificados, foi realizada saponificação em meio básico. Para isso, foi adicionado 0,5 mL de NaOH 0,4 M, previamente borbulhado com nitrogênio. Esta mistura foi submetida à agitação em vórtex (15 s) e à incubação à 37 °C por 30 min no escuro. Após esta etapa, as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 10 min e, em seguida, neutralizadas com 1 mL de HCl 0,4 M. Em seguida, as amostras foram submetidas à nova extração, desta vez com 2 mL de hexano. As amostras foram agitadas em vórtex (1 min) e centrifugadas à 1500g por 2 min à 4 °C. A fase orgânica superior foi coletada e evaporada sob fluxo de nitrogênio e então, ressuspensas em 140 μ L de uma solução contendo H₂O/ACN (80:60). A solução resultante foi centrifugada à 1500g por 10 min, a 4 °C para remoção de partículas insolúveis.

1.3.5.1 Análise de oxi-lipidômica por cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) ionização por electrospray (ESI) e espectrometria de massa de tempo de voo (TOFMS)

As amostras foram analisadas por ESI-TOF-MS (Triple TOF 6600, Sciex, Concord, US) acoplada com um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japan). Para tal, amostras secas foram ressuspensas em água/acetonitrila e o volume de injeção foi de 10 uL. Posteriormente, as amostras foram carregadas em uma coluna Luna Omega (coluna C18; 1,6 um, 2.1 mm x 100 mm; Phenomenex) com um fluxo de 0,25 mL/min e a temperatura do forno foi mantida à 40°C. As condições cromatográficas consistiram em: hidróxido de amônio 0,05 % em água (fase móvel A) e hidróxido de amônio 0,05 % em acetonitrila (fase móvel B). O gradiente cromatográfico consistiu em: de 20 a 47 % de B durante os 7 minutos iniciais; de 47 a 99% de B de 7 a 8 minutos; 99% B de 8 à 13 minutos; de 99 à 20 % de B de 13 à 14 minutos; 20 % de B de 14 à 20 minutos.

O espectrômetro de massas foi operado em ionização por modo negativo, e a faixa de massas analisadas foi de 200 a 1000 Da. A identificação e quantificação dos dados dos lipídios foi realizada através de experimento do tipo "Post acquisition MRM". Fragmentos específicos dos lipídios oxidados foram identificados, assim como descrito previamente (DEROGIS et al., 2013). A aquisição dos dados foi realizada com um tempo de ciclo total de 0,502s com tempo de acúmulo de íon de 0,025 s para o MS e MS/MS. A aquisição dos dados foi realizada em software Analyst 1.7.1. A voltagem aplicada na fonte de íons e no cone foram -4,5 kV e -80 V, respectivamente. Os gases "curtain", "nebulizer" e "heater" foram definidos como 25, 45 e 45 psi, respectivamente. A temperatura da interface foi definida como 450 °C. Os dados de MS/MS foram analisados através do software PeakView e a quantificação foi realizada através do software MultiQuant, onde a área dos picos dos fragmentos específicos foram normalizadas pelo padrão interno. Os experimentos foram realizados em ionização por modo negativo.

1.4 Análise Estatística

Para a realização das análises estatísticas, empregou-se o programa estatístico GraphPad Prism 6.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados foi utilizado o teste de Bartlett. Para dados paramétricos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett's. A ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Dunnett's foi utilizada para avaliar o desempenho no LB, durante os dias de treino e a análise dos hidróxidos dos ácidos graxos. Em caso de análise não paramétrica foi utilizado Kruskal-Wallis, seguida do pós-teste de Dunn's. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média e respectivo erro padrão.

RESULTADOS

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Avaliação comportamental

1.5.1.1 Avaliação da atividade geral no campo aberto (CA)

A tabela 1.1 mostra os parâmetros avaliados no CA em ratas com diferentes idades. Com relação aos parâmetros avaliados, A ANOVA de uma via apontou diferenças significantes na frequência de entrada na zona periférica ($F(2/31) = 16,26$, $p < 0,001$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's mostrou diminuição deste parâmetro em ratas com 12 e 18 ($p < 0,001$) meses de idade ratas jovens. Além disso, também houve diferenças significantes na frequência de levantar ($F(2/31) = 16,98$, $p < 0,0001$) e de *grooming* ($F(2/31) = 32,52$, $p < 0,0001$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição destes parâmetros em ratas com 12 ($p < 0,001$) e 18 meses de idade ($p < 0,0001$) quando comparada às ratas com 3 meses de idade (Tabela 1.1). Dessa forma, os resultados mostraram que houve prejuízo na exploração vertical (comportamento de levantar) e de autolimpeza (*grooming*) entre as idades, porém não houve prejuízo motor, uma vez que não observamos diferenças na velocidade média e nem na distância total percorrida.

Tabela 1.1. Parâmetros da atividade geral em campo aberto de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

Parâmetros	3 meses (n=12)	12 meses (n=12)	18 meses (n=10)
Distância percorrida (cm)	2387 ± 280	2049 ± 221	2668 ± 230
Velocidade média (cm/s)	8,55 ± 0,98	7,14 ± 0,80	9,03 ± 0,76
Tempo ZC (s)	2,22 ± 0,63	1,82 ± 0,93	0,94 ± 0,56
Frequência de entrada ZC	1,25 ± 0,37	0,81 ± 0,46	0,30 ± 0,21
Tempo ZI (s)	7,62 ± 1,80	6,54 ± 2,6	5,42 ± 2,36
Frequência de entrada ZI	6,72 ± 1,28	2,54 ± 0,41	5,4 ± 2,6
Tempo ZP (s)	276,5 ± 9,14	290,1 ± 3,25	291,2 ± 3,05
Frequência de entrada ZP	15,09 ± 2,35	4,58 ± 1,32***	3,7 ± 0,68***
Frequência de levantar	14,45 ± 1,49	3,58 ± 1,45****	5,0 ± 1,6***
Frequência de grooming	4,1 ± 0,48	1,09 ± 0,31****	0,6 ± 0,22****
Bolo fecal (unidade)	2,27 ± 0,80	1,36 ± 0,45	1,3 ± 0,51

n = número de animais por grupo

ZC= zona central; ZI = zona intermediária; ZP = zona periférica

ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett's: *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001 *versus* ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

1.5.1.2 Avaliação da ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE)

Os parâmetros observados no LCE nas ratas com diferentes idades, são mostrados na tabela 1.2. A Análise de Variância não paramétrica Kruskal-Wallis mostrou diferenças significantes entre os grupos quando se avaliou a %EBA (KW(3/34) = 10,46, p<0,0054), bem como na %TBA (KW(3/34) = 11,28, p<0,0036). O pós-teste de Dunn's apontou diminuição na %EBA nas ratas com 12 (p<0,05) e 18 (p<0,01) meses de idade, bem como na %TBA (p<0,01) quando comparada às ratas com 3 meses de idade.

A Anova de uma via mostrou diferenças estatisticamente significantes na frequência de entrada nos BA (F(2/31) = 16,21, p<0,0001), bem como no tempo gasto nos BA (F(2/31) = 16,21, p<0,0002) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição em ambos os parâmetros nas ratas com 12 e 18 meses de idade ratas com 3 meses de idade.

A Anova de uma via mostrou diferenças estatisticamente significantes na frequência de entrada dos BF (F(2/31) = 12,74, p<0,0001), bem como no tempo

gasto nos BF ($F(2/31) = 4,89$, $p < 0,01$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição na frequência de entrada dos BF nas ratas com 12 ($p < 0,001$) e 18 meses de idade ($p < 0,001$) ratas com 3 meses de idade. No que diz respeito ao tempo gasto nos BF, o pós-teste de Dunnett's mostrou diminuição deste parâmetro apenas nas ratas com 18 meses de idade ($p < 0,01$) ratas com 3 meses de idade.

A Anova de uma via mostrou diferenças estatisticamente significantes na frequência de levantar ($F(2/31) = 24,30$, $p < 0,0001$); de *grooming* ($F(2/31) = 5,45$, $p < 0,009$); na avaliação de risco ($F(2/31) = 4,43$, $p < 0,02$) e na frequência de *head dipping* ($F(2/31) = 7,051$, $p < 0,003$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição em todos os parâmetros citados acima nas ratas com 12 e 18 meses de idade ratas com 3 meses de idade. De modo geral, os resultados mostraram que com o avanço da idade houve aumento no comportamento tipo ansioso.

Tabela 1.2. Parâmetros do comportamento no labirinto em cruz elevado de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

Parâmetros	3 meses (n=12)	12 meses (n=12)	18 meses (n=10)
% Entrada BA ^a	30,22 ± 4,01	19,21 ± 6,10*	12,5 ± 6,20**
% Tempo BA ^a	12,35±1,9	4,24±1,32**	9,94±0,56**
Frequência de entrada BA	4,0±0,46	1,0± 0,32****	0,90 ± 0,54****
Tempo (s) BA	7,62±1,80	6,54±2,6**	6,16±3,8***
Frequência de entrada BF	7,0±0,98	2,9±1,56***	2,6±0,5***
Tempo (s) BF	238,7±7,25	252,8±4,2	274,7±12,2**
Frequência de levantar	11,5±1,19	2,9±0,84****	4,3±0,65****
Frequência de <i>grooming</i>	2,0±0,27	0,83±0,24*	0,90 ±0,35*
Frequência de avaliação de risco	4,25±0,6	0,83±0,24*	2,4±0,42*
Frequência de <i>head dipping</i>	5,33±0,97	2,08±0,55*	1,4±0,8**

n = número de animais por grupo

BA = braços abertos; BF = braços fechados

ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett's: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ versus ratas com 3 meses de idade; ^aKruskal- Wallis seguida do pós-teste de Dunns: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

1.5.1.3 Avaliação da ansiedade na caixa claro escuro (CCE)

A figura 1.11 mostra os resultados obtidos na avaliação comportamental realizada na CCE em ratas com diferentes idades. A Anova de uma via mostrou diferenças estatisticamente significantes na latência para a passagem do compartimento claro para o escuro ($F(2/32) = 4,49$, $p < 0,01$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou aumento na latência para a passagem do compartimento claro para o escuro nas ratas com 12 meses de idade ($p < 0,05$) ratas com 3 meses de idade, e diminuição deste parâmetro, em ratas com 18 meses de idade ($p < 0,05$) ratas com 12 meses de idade.

No que diz respeito ao tempo gasto no compartimento claro, a Anova de uma via apontou diferenças estatisticamente significantes ($F(2/32) = 35,91$, $p < 0,0001$), bem como, quando se avaliou o tempo gasto no compartimento escuro ($F(2/32) = 45,91$, $p < 0,01$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's mostrou diminuição no tempo gasto no compartimento claro nas ratas com 12 ($p < 0,001$) e 18 meses ($p < 0,0001$) e, conseqüentemente aumento no tempo gasto no compartimento escuro nesses mesmos animais quando comparados as ratas jovens.

Com relação à frequência de passagem para o compartimento claro, a Anova de uma via mostrou diferenças estatisticamente significantes ($F(2/31) = 74,99$, $p < 0,0001$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição deste parâmetro em ratas com 12 ($p < 0,0001$) e 18 meses de idade ($p < 0,01$) ratas com 3 meses de idade. Além disso, verificou-se aumento deste parâmetro, quando se comparou ratas com 18 meses ($p < 0,05$) 12 meses de idade (Fig.1.11).

A Anova de uma via mostrou diferenças estatisticamente significantes na frequência de cruzamento para o compartimento escuro ($F(2/31) = 45,38$, $p < 0,0001$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição deste parâmetro em ratas com 12 ($p < 0,0001$) e 18 meses de idade ($p < 0,01$) ratas com 3 meses de idade.

Com relação ao número total de cruzamentos, a Anova de uma via mostrou diferenças estatisticamente significantes ($F(2/31) = 63,87$, $p < 0,0001$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição deste parâmetro em ratas com 12 ($p < 0,0001$) e 18 meses de idade ($p < 0,01$) ratas com 3 meses

de idade (Fig.1.11). No entanto, quando se comparou ratas com 12 e 18 meses de idade, observamos que as ratas senescentes apresentaram maior número de transições ($p<0,05$) que as ratas de meia idade. Dessa forma, os resultados da caixa claro-escuro corroboram os achados no labirinto em cruz elevado, evidenciando novamente aumento do comportamento tipo ansiedade com o avanço da idade.

Figura 1.11. Parâmetros do comportamento na caixa claro-escuro de ratas com diferentes idades.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, $n = 10 - 12$ animais por grupo. Anova de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ *versus* ratas com 3 meses de idade, # $p<0,05$ ratas com 12 meses *versus* ratas com 18 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

1.5.1.4 Avaliação da memória episódica no teste de Reconhecimento de Objetos (RO)

A análise estatística não paramétrica revelou diferenças estatisticamente significantes no índice de discriminação entre as idades. O pós-teste de Dunn's mostrou diminuição deste parâmetro em ratas com 12 meses ($p < 0,05$) e 18 ($p < 0,01$) meses de idade, ou seja, ambas as ratas obtiveram escore negativo, indicando maior tempo gasto com o OF (Fig. 1.12).

Com relação ao índice de preferência (%), a análise não paramétrica apontou diferenças estatisticamente significante (KW (3/34) = 15,39, $p < 0,0005$) entre as idades. O pós-teste de Dunn's mostrou diminuição deste parâmetro em ratas com 18 meses ($p < 0,001$) ratas jovens. No entanto, vale comentar que um IP abaixo de 50% indica preferência pelo OF, sendo assim, ambas as ratas com 12 e 18 meses apresentaram um IP abaixo de 50% (Fig.1.12). Dessa forma, os resultados mostraram que com o avanço da idade há prejuízo na memória episódica.

Figura 1.12. Avaliação da memória tipo episódica no teste de reconhecimento de objetos de ratas com diferentes idades.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, $n = 10 - 12$ animais por grupo. Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn's: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

1.5.1.5 Avaliação da memória espacial no labirinto de Barnes (LB)

Com relação à latência para encontrar a CE, a Anova de duas vias mostrou diferenças estaticamente significantes entre as idades ($F(2/155) = 16,03$, $p < 0,0001$), tempo de observação ($F(4/155) = 2,696$, $p < 0,0329$), sem interação ($8/155) = 1,505$, $p = 0,1596$) entre os fatores. O pós-teste de Dunnett's apontou aumento na latência para encontrar a CE no 2º dia de treino, em ratas com 12 meses de idade ($p < 0,01$), no 3º dia em ratas com 12 ($p < 0,01$) e 18 meses ($p < 0,05$) de idade, bem como no 4º e último dia de treino em ratas com 12 meses de idade ($p < 0,05$) quando comparada as ratas jovens. No dia do teste, o pós-teste de Dunnett's mostrou aumento na latência para encontrar a CE em ratas com 12 ($p < 0,001$) e 18 ($p < 0,05$) meses de idade *versus* ratas jovens (Fig.1.13).

Quando avaliamos o número de erros, a Anova de duas vias mostrou diferenças estaticamente significantes entre as idades ($F(2/155) = 15,67$, $p < 0,0001$), dias de observação ($F(4/155) = 3,037$, $p < 0,0192$) e interação ($8/155) = 2,726$, $p < 0,0077$) entre os fatores. O pós-teste de Dunnett's, mostrou aumento no NE para encontrar a CE no 2º dia ($p < 0,001$), 3º dia ($p < 0,01$) e no 4º dia ($p < 0,01$) de treino em ratas com 12 meses de idade; quando se avaliou as ratas com 18 meses, o pós-teste apontou aumento no NE apenas 4º dia de treino ($p < 0,05$) *versus* ratas jovens (Fig.1.13). No dia do teste, o pós-teste apontou aumento no NE em ratas com 12 meses de idade ($p < 0,05$) *versus* ratas com 3 meses de idade. Dessa forma, os resultados mostraram que ambas ratas com 12 e 18 meses de idade apresentaram prejuízo no processo de aquisição e consolidação da memória.

Acrescente-se, ainda, que notamos que as ratas com 12 meses e 18 meses de idade permaneciam em frente ao orifício que continha a CE e, mesmo após tê-la encontrado, algumas permaneciam paradas em frente ao orifício, como estivessem “desorientadas”.

Figura 1.13. Desempenho no labirinto de Barnes durante os dias de treino e no dia do teste em ratas com diferentes idades.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, $n = 10 - 12$ animais por grupo. ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Dunnett's: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ *versus* ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

1.5.2 Análise sérica de estradiol

A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes ($F(2/27) = 6,929$, $p < 0,0037$) nos níveis de estradiol entre as idades. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição ($p < 0,01$) dos níveis séricos de estradiol em ratas com 18 meses de idade quando comparada com as ratas jovens (Fig.1.14)

Figura 1.14. Avaliação dos níveis séricos de estradiol em ratas com diferentes idades.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, $n = 10$ animais por grupo. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: ** $p < 0,01$ *versus* ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

1.5.3 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos

Os resultados dos níveis de neurotransmissores estão apresentados em quatro tabelas conforme a região encefálica avaliada

A tabela 1.3 mostra os resultados da avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no córtex pré-frontal de ratas com diferentes idades. A Anova de uma via apontou diferenças estatisticamente significantes nos níveis de DOPAC ($F(2/25) = 22,18$, $p < 0,0001$), bem como na razão DOPAC/DA ($F(2/25) = 6,888$, $p < 0,0043$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição significativa nos níveis de DOPAC nas ratas com 12 e 18 meses de idade ($p < 0,0001$) ratas com 3 meses de idade; bem como diminuição na razão DOPAC/DA em ratas com 12 meses ($p < 0,01$) e 18 meses de idade ($p < 0,05$) quando comparada às ratas jovens.

A tabela 1.4 mostra os resultados referente a avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no hipotálamo de ratas com diferentes idades. A Anova de uma via apontou diferenças estatisticamente significantes nos níveis de DOPAC ($F(2/27) = 3,86$, $p < 0,0044$); na razão DOPAC/DA ($F(2/27) = 9,696$, $p < 0,0007$) e VMA/NA ($F(2/27) = 5,847$, $p < 0,0078$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição dos níveis de DOPAC ($p < 0,05$) em ratas com 12 e 18 meses de idade, diminuição do *turnover* DOPAC/DA ($p < 0,001$) em ratas com 12 meses e do *turnover* VMA/NA ($p < 0,01$) em ratas com 18 meses de idade ratas jovens.

A tabela 1.5 mostra os resultados da avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no hipocampo de ratas com diferentes idades. A Anova de uma via apontou diferenças estatisticamente significantes nos níveis de DA ($F(2/27) = 4,688$, $p < 0,01$); DOPAC ($F(2/27) = 20,13$, $p < 0,0001$); HVA ($F(2/26) = 3,803$, $p < 0,03$); NA ($F(2/27) = 4,437$, $p < 0,02$); bem como na razão VMA/NA ($F(2/27) = 46,72$, $p < 0,0001$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's mostrou diminuição nos níveis de DA e HVA em ratas com 18 meses ($p < 0,05$), diminuição nos níveis de DOPAC em ratas com 12 e 18 meses de idade ($p < 0,0001$); e diminuição nos níveis de NA em ratas com 18 meses de idade ($p < 0,05$), aumento do *turnover* VMA/NA em ratas com 12 e 18 meses de idade ($p < 0,0001$) ratas jovens.

A tabela 1.6 mostra os resultados referente à avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos no estriado de ratas com diferentes idades. A Anova de uma via apontou diferenças estatisticamente significantes nos níveis de DOPAC ($F(2/27) = 5,548$, $p < 0,009$), HVA ($F(2/27) = 5,683$, $p < 0,0087$), bem como na razão HVA/DA ($F(2/27) = 5,94$, $p < 0,007$) e, além disso, na razão VMA/NA ($F(2/27) = 3,991$, $p < 0,03$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's mostrou diminuição nos níveis de DOPAC em ratas com 12 e 18 meses de idade ($p < 0,05$); diminuição nos níveis de HVA em ratas com 18 meses ($p < 0,01$), bem como diminuição na razão HVA/DA em ratas com 18 meses ($p < 0,01$) ratas jovens. No que diz respeito a razão VMA/NA, o pós-teste apontou diminuição deste parâmetro em ratas com 12 meses de idade ($p < 0,05$) ratas jovens.

Em suma, os resultados mostraram que com o avanço da idade há diminuição nos níveis de neurotransmissores, principalmente de DA em diferentes regiões encefálicas.

Tabela 1.3. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no córtex pré-frontal de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

NT ou MB	3 meses n=10	12 meses n = 9	18 meses n = 9
DA	33 ± 5,08	36,6 ± 4,12	36,5 ± 8,4
DOPAC	43,5 ± 2,75	26,50 ± 1,25****	28 ± 1,90****
DOPAC/DA	1,52 ± 0,19	0,85 ± 0,09**	1,02 ± 0,13*
HVA	4,55 ± 1,05	3,16 ± 0,6	3,4 ± 0,80
HVA/DA	0,14 ± 0,23	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,04
5-HT	3443 ± 222	3177 ± 278	3155 ± 285
5-HIAA	943,7 ± 90,9	969,7 ± 152,8	1036 ± 140,7
5HIAA/5-HT	0,26 ± 0,01	0,32 ± 0,07	0,32 ± 0,02
NA	576,8 ± 37,8	667,9 ± 62	659 ± 57,2
VMA	338,5 ± 24,5	349,7 ± 21	353,2 ± 29,9
VMA/NA	0,60 ± 0,05	0,53 ± 0,03	0,54 ± 0,02
GABA	15,65 ± 0,60	14,40 ± 0,80	17,30 ± 1,25
GLUTAMATO	56,70 ± 6,10	53,60 ± 2,85	63,05 ± 4,85

n= número de ratas por grupo.

DA = dopamina, DOPAC = ácido 3,4, dihidroxifenilacético, HVA = ácido homovanílico, 5-HT = serotonina, 5-HIAA = ácido 5-hidroindolacético, NA = noradrenalina, VMA = ácido vanil-mandélico, GABA = ácido gama-aminobutírico.

ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001 *versus* ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

Tabela 1.4. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no hipotálamo de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

NT ou MB	3 meses n = 10	12 meses n = 10	18 meses n = 10
DA	316,1 ± 36,20	324,2 ± 33,21	263,2 ± 35,10
DOPAC	64,20 ± 6,60	43,50 ± 4,40**	41,40 ± 3,50**
DOPAC/DA	0,21 ± 0,01	0,14 ± 0,009***	0,18 ± 0,008
HVA	5,40 ± 0,80	4,50 ± 0,30	4,40 ± 0,65
HVA/DA	0,0018 ± 0,002	0,015 ± 0,002	0,020 ± 0,003
5-HT	3000 ± 168	3275 ± 270	2458 ± 237
5-HIAA	1383 ± 71	1540 ± 49,70	1519 ± 197
5HIAA/5-HT	0,46 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,53 ± 0,03
NA	1500 ± 95,30	1850 ± 116	1897 ± 202
VMA	288,5 ± 16,30	301,5 ± 24	266,3 ± 39,3
VMA/NA	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,009	0,14 ± 0,01**
GABA	10,45 ± 0,55	12,70 ± 0,60	14,30 ± 4,10
GLUTAMATO	29,20 ± 2,40	35,25 ± 2,70	30,20 ± 3,50

n= número de ratas por grupo.

DA = dopamina, DOPAC = ácido 3,4, dihidroxifenilacético, HVA = ácido homovanílico, 5-HT = serotonina, 5-HIAA = ácido 5-hidroxindolacético, NA = noradrenalina, VMA = ácido vanil-mandélico, GABA = ácido gama-aminobutírico.

ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 *versus* ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

Tabela 1.5. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no hipocampo de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

NT ou MB	3 meses n = 10	12 meses n = 10	18 meses N = 10
DA	20 ± 4,15	11,65 ± 2,05	8,55 ± 1,05*
DOPAC	45,12 ± 2,85	26 ± 2,64****	25,9 ± 1,8****
DOPAC/DA	4,23 ± 1,32	3,14 ± 0,70	3,17 ± 0,50
HVA	4,22 ± 1,3	3,9 ± 0,63	1,66 ± 0,35*
HVA/DA	0,45 ± 0,20	0,50 ± 0,15	0,19 ± 0,05
5-HT	2172 ± 521	1578 ± 88,90	1270 ± 127
5-HIAA	1541 ± 133,7	1588 ± 69,25	1251 ± 89,44
5HIAA/5-HT	0,92 ± 0,09	1,02 ± 0,05	1,07 ± 0,15
NA	645 ± 128	587,7 ± 44,7	448,6 ± 27,4*
VMA	318,7 ± 15	282,4 ± 21	284,3 ± 16
VMA/NA	0,46 ± 0,05	2,13 ± 0,17****	1,62 ± 0,13****
GABA	16,15 ± 2,55	14,00 ± 3,05	14,20 ± 2,50
GLUTAMATO	44,50 ± 6,05	34,70 ± 3,12	40,90 ± 3,90

n= número de ratas por grupo.

DA = dopamina, DOPAC = ácido 3,4, dihidroxifenilacético, HVA = ácido homovanílico, 5-HT = serotonina, 5-HIAA = ácido 5-hidroindolacético, NA = noradrenalina, VMA = ácido vanil-mandélico, GABA = ácido gama-aminobutírico.

ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: *p<0,05, **, ****p<0,0001 *versus* ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

Tabela 1.6. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no estriado de ratas com diferentes idades. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

NT ou MB	3 meses n = 10	12 meses n = 10	18 meses n = 10
DA	7105 ± 605	6561 ± 397	6714 ± 384
DOPAC	711 ± 48	577 ± 29,5*	569,7 ± 26,7*
DOPAC/DA	0,096 ± 0,004	0,089 ± 0,003	0,086 ± 0,005
HVA	216,6 ± 16,7	174,9 ± 11,35	152,8 ± 12**
HVA/DA	0,031 ± 0,002	0,027 ± 0,001	0,022 ± 0,001**
5-HT	1838 ± 108	2049 ± 152	1914 ± 130
5-HIAA	1702 ± 83,3	1949 ± 146,2	2029 ± 169,8
5HIAA/5-HT	0,93 ± 0,03	0,96 ± 0,06	1,06 ± 0,05
NA	280,4 ± 21,8	337,7 ± 17,3	307 ± 23,8
VMA	331 ± 24,6	319,5 ± 14,5	326,9 ± 22,2
VMA/NA	1,20 ± 0,08	0,96 ± 0,05*	1,07 ± 0,04
GABA	9,60 ± 0,70	10,90 ± 0,95	8,90 ± 0,90
GLUTAMATO	23,50 ± 1,40	21,75 ± 1,75	21,20 ± 1,15

n= número de ratas por grupo

DA = dopamina, DOPAC = ácido 3,4, dihidroxifenilacético, HVA = ácido homovanílico, 5-HT = serotonina, 5-HIAA = ácido 5-hidroxindolacético, NA = noradrenalina, VMA = ácido vanil-mandélico, GABA = ácido gama-aminobutírico

ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: *p<0,05, **p<0,01 *versus* ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

1.5.4 Análise de oxi-lipidômica por cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) ionização por electrospray (ESI) e espectrometria de massa de tempo de voo (TOFMS)

A figura 1.15 mostra o perfil dos hidróxidos (em ng/ mg de tecido) do DHA (HDoHE), dos hidróxidos do ácido linoleico (HODE), dos hidróxidos do ácido oleico (HOA) e dos hidróxidos do ácido araquidônico (HETE) no córtex pré-frontal de ratas com 12 e 18 meses de idade.

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significante nos níveis de hidróxidos do AA (HETE) ($F(5/114) = 35,45$, $p<0,0001$), diferenças entre a idade ($F(1/114) = 12,86$, $p<0,0005$) e interação $F(5/114) = 3,284$, $p<0,0083$) entre os fatores. Dentre os hidróxidos do AA analisado, o pós-teste de Dunnett's apontou

diminuição nos níveis dos hidróxidos 15/14 e do 12 em ratas com 18 meses de idade (Fig.1.15).

Figura 1.15. Perfil dos hidróxidos (em pg/mg de tecido) do ácido docosahexaenóico (HDoHE), do ácido linoleico (HODE), do ácido oleico (HOA) e do ácido araquidônico (HETE) no córtex pré-frontal de ratas com 12 e 18 meses de idade.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, n = 10 (ratas com 3 meses de idade) e 11 (ratas com 18 meses de idade). ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Dunnett's: *p<0,05, ***p<0,001 *versus* ratas com 3 meses de idade.

Fonte: Sandini (2017).

DISCUSSÃO

1.6 DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizamos ratas Wistar com 3, 12 e 18 meses de idade, pois representam, respectivamente, a fase jovem, a meia-idade e a senescente. Contudo, a literatura é bastante divergente com relação a classificação da faixa etária desses animais, uma vez que há autores que consideram idoso um rato com idade entre 18 a 22 meses (MEYZA et al., 2011; HOVENS et al., 2013; SALEEM et al., 2014), enquanto outros trabalhos usam o termo senescente para ratos com mais de 24 meses de idade (ARAFAT; ALI, 2014; MOREL et al., 2015).

Ratas com 3 meses de idade são consideradas jovens, pois apresentam maturação sexual, que é atingida em torno de 6 semanas de vida (SENGUPTA, 2013). Ratas jovens apresentam regularidade no ciclo estral, porém com o passar do tempo se observa irregularidade desse ciclo acompanhada de declínio nos níveis de estradiol e de progesterona, que tem início aos 12 meses de idade (MOORTHY et al., 2005). Já ratas com 9 meses de idade apresentam irregularidade de 7% no ciclo estral, enquanto ratas com 12 meses mostram 65% de irregularidade nas fases estrais (LU et al., 1979).

Ratas Wistar com 12 meses de idade têm sido utilizadas como modelo natural de menopausa (MOORTHY et al., 2005), porém a senescência reprodutiva ocorre entre 15 e 20 meses de idade (SENGUPTA, 2013). No presente estudo, observamos diminuição significativa dos níveis de estradiol somente nas ratas com 18 meses de idade. Contudo, nas ratas com 12 meses de idade, verificamos resultado bastante heterogêneo, uma vez que seis ratas deste grupo apresentaram média de 7,0 pg/mL de estradiol, enquanto quatro ratas apresentaram média mais alta de 12,3 pg/mL de estradiol. Ressalte-se que essa distribuição heterogênea observada nos níveis de estradiol em ratas com 12 meses de idade, pode mimetizar o que é observado nas mulheres na menopausa, uma vez que a idade média para início deste marco é de 51 anos e pode variar entre 40 a 60 anos (TE VELDE; PEARSON, 2002). Por isso, no presente estudo empregamos três faixas etárias, as quais correspondem à

diferentes fases da vida de um roedor para a avaliação comportamental, neuroquímica e de ácidos graxos.

A atividade locomotora das ratas foi avaliada no CA, aparato desenvolvido na década de 1930, inicialmente com o objetivo de observar a “emocionalidade” em roedores e, atualmente, é amplamente utilizado para avaliar a atividade motora e exploratória (PRUT; BELZUNG, 2003; BELVIRANLI et al., 2012). Nossos resultados não mostraram diferenças significantes na distância total percorrida (cm) e nem na velocidade média (cm/s) entre as faixas etárias, descartando, assim, qualquer deficiência motora entre as diferentes idades avaliadas. No entanto, há estudos em roedores, que apontam diminuição da atividade motora com o aumento da idade (TODOROVIC et al., 2003; GLENN et al., 2008; MEYZA et al., 2011).

Quanto aos demais parâmetros avaliados no CA, as ratas com 12 e 18 meses de idade apresentaram menor frequência de entrada na ZP, porém sem diferença significativa no tempo gasto nessa zona, quando comparadas às ratas jovens. Contudo, uma vez que estas ratas entraram na ZP, observamos preferência por esta zona, uma vez que permaneceram nesta região por quase toda a análise comportamental. Sabe-se que este é um comportamento normal, pois ambientes abertos são naturalmente aversivos para os roedores; assim, estes têm preferência pela região periférica do CA (PRUT; BELZUNG, 2003). Ressalta-se, ainda, que nesta região é possível realizar o comportamento de tigmotaxia (movimento que o rato faz com as vibrissas na parede do aparato, no intuito de receber informações sensoriais do meio), conferindo segurança ao animal (PRUT; BELZUNG, 2003). Ainda, considerando as diferentes zonas do CA, nossos resultados não apontaram diferenças significantes no tempo gasto em cada uma (ZC, ZI e ZP). No entanto, vale a pena comentar que diferentes estudos mostram que, em roedores, o aumento da idade causa diminuição do tempo gasto na ZC (KÜÇÜK et al., 2008; PIETRELLI et al., 2012; SALEEM et al., 2014).

Quando avaliamos a frequência de levantar e de *grooming*, observamos que as ratas com 12 e 18 meses apresentaram diminuição de ambos os comportamentos. Sabe-se que, a frequência de levantar é indicativo de comportamento exploratório vertical e está relacionada com o sistema dopaminérgico (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1984; PIETRELLI et al., 2012),

enquanto o *grooming* pode estar relacionado aos diferentes sistemas de neurotransmissão, como o sistema dopaminérgico, serotoninérgico e o GABAérgico (BERTOLINI; POGGIOLI; VERGONI, 1988; BARROS et al., 1994). Esses resultados corroboram dados na literatura que apontam que o comportamento de *grooming* diminui em ratos idosos (PIETRELLI et al., 2012).

O LCE é um modelo amplamente utilizado para avaliar o efeito ansiolítico de drogas, principalmente, de compostos benzodiazepínicos, pois estes aumentam o tempo de permanência e entrada nos BA (HOGG, 1996). O teste baseia-se na aversão natural de roedores aos espaços abertos; além disso, há um conflito relacionado ao ambiente novo, bem como a impossibilidade de realizar o comportamento de tigmotaxia nos BA (PELLOW et al., 1985). No presente estudo, verificamos que as ratas com 12 e 18 meses de idade apresentaram menor porcentagem de tempo e entrada nos BA, evidenciando ansiedade/neofobia acentuada. Nesse sentido, vale a pena comentar que a preferência pelos BA e pelos BF é um índice fidedigno de ansiedade, ou seja, quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas e tempo gasto nos BA (PELLOW; FILE, 1986). Ainda, observamos que em ambas idades, as ratas apresentaram diminuição da frequência de *grooming*, levantar, avaliação de risco e de *head dipping*. Nesse caso, os comportamentos de avaliação de risco e de *head dipping* estão relacionados com maior índice de ansiedade, juntamente com a diminuição da frequência nos BA (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001). Com relação aos achados da frequência de levantar e de *grooming*, estes corroboram os resultados do CA, evidenciando o envolvimento do sistema dopaminérgico e serotoninérgico.

A caixa claro-escuro, assim como o LCE, é um teste utilizado para verificar efeitos ansiolíticos e/ou ansiogênicos. Esse modelo é baseado na aversão natural de roedores à um novo ambiente, associado ou não com agentes estressores leves, como, por exemplo a luminosidade (CRAWLEY, 1981). A passagem entre os compartimentos tem sido utilizada como um índice de ansiedade, bem como o tempo gasto em cada compartimento, sendo que quanto maior o tempo gasto no compartimento escuro, maior efeito ansiogênico (CRAWLEY, 1981; BOURIN; HASCOËT, 2003). Nossos resultados mostraram que as ratas com 12 meses de idade apresentaram maior latência para cruzar para o compartimento escuro da caixa. Por outro lado, estas ratas

permaneceram por mais tempo no compartimento escuro, apresentaram menor número de cruzamento para o compartimento claro e, conseqüentemente, menor número de cruzamento total, ou seja, uma vez que entraram no compartimento escuro, permaneceram neste até o término do teste. Vale a pena comentar que a demora da passagem para o compartimento escuro pode ter ocorrido devido ao comportamento de *freezing* (congelamento) observado quando essas ratas foram introduzidas no compartimento claro. Além disso, sabe-se que roedores podem demorar mais tempo para sair do compartimento mais familiar (nesse caso, o claro) e entrar no ambiente novo, não familiar (o escuro). Os resultados referentes às ratas senescentes foram semelhantes às ratas de meia-idade, diferindo apenas na latência para a passagem para o compartimento escuro, sendo que estas apresentaram menor latência para a transição. Desse modo, fica evidente que houve aumento do comportamento tipo-ansioso em ratas com 12 e 18 meses de idade, corroborando os resultados do LCE.

Já está bem estabelecido que o envelhecimento no ser humano está relacionado a mudanças físicas, fisiológicas e emocionais, como o aumento da ansiedade e da depressão (BRYANT; JACKSON; AMES, 2008; LENZE; WETHERELL, 2011; MOHLMAN et al., 2012). Em modelos animais, a literatura tem apontado uma correlação positiva entre o aumento da ansiedade e a idade em roedores, após à exposição a agentes estressores ou não (BOGUSZEWSKI; ZAGRODZKA, 2002; MEYZA et al., 2011; BELVIRANLI et al., 2012). No entanto, um estudo conduzido por Bergardo et al. (2011), em ratos com 2 e 24 meses de idade, não apontou diferenças na ansiedade, pelo contrário, os ratos idosos exploraram mais os braços abertos do LCE. Essa divergência de resultados pode ser devido a diferentes fatores, como habituação no ambiente, nível de iluminação no momento do teste, duração do teste, bem como pré-teste ou tratamento prévio (RODGERS; DALVI, 1997). No presente estudo, não usamos agentes estressores no LCE e nem habituação prévia em ambos os testes utilizados para avaliar ansiedade; dessa forma, podemos inferir que o único fator responsável pela diferença na ansiedade foi o aumento da idade entre os grupos.

Ainda com relação as alterações emocionais, sabe-se que a serotonina desempenha importante papel fisiológico na manifestação de diversos comportamentos, destacando-se principalmente aqueles relacionados aos transtornos de ansiedade (BELL; ABRAMS; NUTT, 2001; ROSSI; TIRAPEGUI,

2004). Nossos resultados não mostraram diferenças significantes nos níveis de 5-HT, bem como de seu metabólito 5HIAA, em nenhuma das regiões encefálicas analisadas nas ratas com diferentes idades. Contudo, sabe-se que a participação da 5-HT pode ocorrer tanto diretamente, como indiretamente, através da ativação de receptores serotoninérgicos específicos, bem como pela modulação de outros sistemas de neurotransmissão, incluindo o colinérgico, glutamatérgico, dopaminérgico e GABAérgico (BUHOT; MARTIN; SEGU, 2000; JELTSCH-DAVID; KOENIG; CASSEL, 2008; OLVERA-CORTÉS et al., 2008). Nesse sentido, é plausível considerar que os níveis de 5-HT não foram alterados por meio de mecanismos compensatórios, que possam estar ocorrendo de forma direta ou indireta nos demais sistemas de neurotransmissão.

Ressalta-se ainda que muitas regiões encefálicas, bem como diferentes neurotransmissores estão envolvidos na modulação e expressão da ansiedade (CANTERAS et al., 2010; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015). Recentemente, um dos neurotransmissores que tem ganhado destaque no envolvimento de respostas comportamentais para estímulos naturalmente ansiogênicos do meio ambiente é a dopamina, que parece desempenhar importante papel na ansiedade e no medo (DE LA MORA et al., 2010; DIAZ et al., 2011; ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015). No que diz respeito às regiões que participam do comportamento tipo ansiedade destacam-se o hipocampo (ROSTAMI; HAJIZADEH-MOGHADDAM; ZARRINDAST, 2006; ASHABI et al., 2011), a amígdala (ZARRINDAST et al., 2011; PALOMARES-CASTILLO et al., 2012), o CPF (PELEG-RAIBSTEIN et al., 2005; FOGAÇA et al., 2012) e o núcleo accumbens (ZARRINDAST et al., 2008). A relação entre DA e ansiedade ainda não está totalmente esclarecida, no entanto, alguns estudos têm associado a diminuição da DA com o aumento da ansiedade (WALL et al., 2003; ROBINSON et al., 2006). De fato, observamos que as ratas com 12 e 18 meses de idade mostraram aumento do comportamento tipo-ansioso no LCE e na CCE, e diminuição dos níveis de DA e de seus metabólitos (DOPAC e HVA) no hipocampo, no CPF e no hipotálamo, regiões associadas ao comportamento tipo-ansiedade, bem como no estriado. Dessa forma, é possível sugerir o envolvimento da DA em transtornos de ansiedade, principalmente aqueles relacionados com o aumento da idade. Além disso, a diminuição dos níveis de DA observada no presente estudo, pode estar relacionada com a redução dos

transportadores de DA, bem como com a diminuição do número de receptores D1 e D2 nas regiões encefálicas avaliadas (WANG et al., 1998; KAASINEN et al., 2000).

O processo de envelhecimento além de contribuir para a ansiedade, também pode causar prejuízo em diversas habilidades cognitivas, incluindo memória episódica, bem como na velocidade de processamento das informações (WETHERELL et al., 2002). O aprendizado e a memória estão intrinsicamente ligados, pois o primeiro é uma modificação do comportamento como resultado de uma experiência ou aquisição de um novo conhecimento sobre determinado meio. A memória, por sua vez, é a retenção deste conhecimento por um determinado tempo. Assim, ambos mecanismos cerebrais estão ligados a diversos processos neurais responsáveis pela atenção, motivação e outros processos neuropsicológicos que, de alguma forma, podem afetar o aprendizado e a memória (SOUZA, 2001).

Sabe-se que o hipocampo, principalmente a região dorsal, é responsável em grande parte pelo processo de aprendizagem e memória espacial (PRESTON; EICHENBAUM, 2013). A literatura aponta dois testes comportamentais hipocampo-dependentes que são amplamente utilizados em roedores para avaliar a memória espacial: o labirinto aquático de Morris e o labirinto de Barnes (LB); ambos testes utilizam pistas visuais para a memorização e o aprendizado da caixa de escape (PERROT-SINAL et al., 1996; HARRISON et al., 2006; FARAJI; METZ; SUTHERLAND, 2010). Dentre esses testes, o labirinto aquático de Morris é mais utilizado, porém por se tratar de um teste aquático, a água pode ser um estímulo aversivo para o roedor, desencadeado estresse emocional, além de exigir grande esforço físico para a natação (POMPL et al., 1999; HOLMES et al., 2002). Além disso, aspectos emocionais podem prejudicar o desempenho de animais idosos em tarefas cognitivas (KÜÇÜK et al., 2008). Dessa forma, optamos pelo LB por ser menos ansiogênico e aversivo que o labirinto aquático de Morris, além de exigir menor aptidão física, uma vez que estamos avaliando animais com diferentes idades.

Nossos resultados mostraram que no primeiro dia do treino, pela manhã, as ratas jovens apresentaram pior desempenho (maior latência) para encontrar a CE, pois observamos que no primeiro contato com o LB as ratas jovens entravam rapidamente no primeiro orifício, ou seja, na maioria das vezes no local

errado, sem explorar o ambiente. No entanto, ainda nesse mesmo dia, no segundo treino realizado no período da tarde, notamos que esse prejuízo foi sanado, pois o aprendizado das ratas jovens foi rápido e manteve-se uniforme durante os dias de treino, até o dia do teste. Provavelmente, esse prejuízo no 1º treino possa ter ocorrido, devido ao fato das ratas jovens terem sido menos manipuladas ao longo de sua vida em comparação com as ratas de meia-idade e as senescentes.

Com relação aos demais resultados obtidos no LB, ambas as ratas dos grupos de 12 e 18 meses mostraram aumento na latência para encontrar a CE, bem como aumento no NE durante os dias de treino, de maneira semelhante ao observado no dia do teste. Dessa forma, fica evidente que as ratas de meia-idade e senescentes apresentaram prejuízo na aquisição, consolidação e manutenção da memória espacial em relação às ratas jovens. Nossos resultados corroboram dados da literatura que apontam que ratos idosos (acima de 18 meses de idade) apresentam prejuízo em tarefas de memória hipocampo-dependentes ou não (JACOBSON et al., 2008; HAIDER et al., 2014; SALEEM et al., 2014), evidenciando que o processo de aprendizagem é prejudicado com o envelhecimento.

Em pacientes com Doença de Alzheimer em fase leve a moderada observa-se distúrbios de atividade, como, por exemplo, andar errante e comportamentos inapropriados e sem finalidade (GALLAGHER et al., 2011). De maneira semelhante, notamos em nosso estudo que ratas com 12 e 18 meses de idade, apresentaram no LB comportamentos similares àqueles vistos em seres humanos, ou seja, estas ratas permaneciam em frente ao orifício que continha a CE e, mesmo após ter encontrado a CE, algumas permaneciam paradas em frente ao orifício. Além disso, observamos que mesmo após terem encontrado a CE, as ratas continuavam a explorar o ambiente, como se estivessem “perdidas”. Apesar das diferenças evidentes entre o comportamento humano e o animal, especulamos que estas observações, em particular, assemelham-se aos comportamentos citados acima exibidos por pacientes com Doença de Alzheimer leve a moderada.

Além da memória espacial, avaliamos também a memória episódica, uma vez que está é geralmente afetada pelo processo de envelhecimento. Esse tipo de memória refere-se à capacidade de codificar, recordar acontecimentos e

experiências, e pode ser avaliado através da memória de reconhecimento (BROADBENT et al., 2010; BENGOTXEA; RODRIGUEZ-PERDIGON; RAMIREZ, 2015). Para tal avaliação, em roedores, tem sido utilizado o teste de reconhecimento de objetos, que não requer reforços positivos ou negativos, não desencadeia estresse, apresenta curta duração e não exige aparato específico, ou seja, pode ser avaliado na arena do CA (ANTUNES; BIALA, 2012; BENGOTXEA; RODRIGUEZ-PERDIGON; RAMIREZ, 2015). Além disso, já está bem estabelecido que ratos possuem maior preferência em explorar objetos novos em comparação aos familiares (BEVINS; BESHEER, 2006). Nossos resultados mostraram que as ratas com 12 e 18 meses de idade apresentaram índice de discriminação negativo, bem como índice de preferência abaixo de 50% pelo objeto novo, o que denota preferência pelo objeto familiar e, consequentemente, prejuízo da memória tipo episódica.

A integridade de diferentes regiões encefálicas é crucial para o desempenho no RO. Sabe-se que lesões hipocampais e corticais prejudicam o desempenho no RO (CLARK; ZOLA; SQUIRE, 2000; WINTERS; BUSSEY, 2005; COHEN et al., 2013; ZEAMER; BACHEVALIER, 2013). O hipocampo recebe informações a partir do córtex perirrinal, que *per se* é o local de entrada de diversas informações, como visual, olfatória e estímulos somatossensoriais, todas importantes para o RO (BROWN; AGGLETON, 2001; NORMAN; EACOTT, 2005).

Sabe-se que diferentes sistemas de neurotransmissão estão envolvidos com a formação e consolidação da memória. No que diz respeito ao RO em roedores, sabe-se que ocorre a participação dos receptores NMDA no hipocampo, mediada pelos receptores AMPA, indicando a importância da transmissão glutamatérgica (DERE; HUSTON; DE SOUZA SILVA, 2007). Contudo, nossos resultados não mostraram diferenças significantes nos níveis de glutamato no hipocampo. Porém, não podemos descartar a hipótese da participação dos outros sistemas de neurotransmissão que foram afetados, como, por exemplo, o dopaminérgico e o noradrenérgico no desempenho da memória tipo episódica.

De fato, os déficits de aprendizagem e memória observados em animais idosos têm sido associados às alterações nos níveis de neurotransmissores, especialmente no hipocampo (ROSENZWEIG; BARNES, 2003). Além disso, o

CPF, principalmente a região medial, parece desempenhar papel fundamental na memória, em particular, na recuperação de memórias remotas (TAKASHIMA et al., 2006). Como mencionado anteriormente, a memória pode ser modulada por diferentes sistemas de neurotransmissão, como o glutamatérgico, o noradrenérgico, o GABAérgico, o serotoninérgico, bem como o dopaminérgico (MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000; ROGERS; KESNER, 2003; HASSELMO, 2006; BETHUS; TSE; MORRIS, 2010; MENESES; LIY-SALMERON, 2012; MICHELS et al., 2012). Sabe-se que qualquer alteração na integridade funcional desses sistemas pode contribuir para redução na sinalização neuronal, podendo gerar distúrbios comportamentais, tanto no envelhecimento normal como no patológico (YOU DIM; JOSEPH, 2001). Nesse sentido, há relatos na literatura que indicam importantes alterações em vários sistemas de neurotransmissão relacionados com diminuição no número de neurônios, redução na síntese ou na concentração de neurotransmissores; porém, esses dados são contraditórios com relação à idade e as mudanças que ocorrem nos sistemas adrenérgico, colinérgico, dopaminérgico e serotoninérgico (HARIK; MCCracken, 1986; MACHADO; CANO; SANTIAGO, 1986; MCENTEE; CROOK, 1991; FISCHER et al., 1992).

Nossos resultados mostraram alterações nos níveis DA e seus metabólitos DOPAC e HVA em ratas com 12 e 18 meses de idade, em todas as regiões analisadas (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e hipotálamo). Com relação ao *turnover* da DA, observamos diminuição da razão DOPAC/DA no córtex pré-frontal e no hipotálamo de ratas com 12 meses de idade, enquanto em ratas com 18 meses de idade houve diminuição da razão HVA/DA no estriado, indicando redução da atividade desse sistema. Ressalte-se que nossos achados corroboram dados que apontam declínio nos níveis de DA e do seu metabólito DOPAC em ratos idosos (acima de 18 meses), principalmente em regiões com inervação dopaminérgica (PONZIO F et al., 1982; VENERO; MACHADO; CANO, 1991; MA et al., 1999; MÍGUEZ et al., 1999). Vale lembrar que no CA não houve diferenças significantes na distância total percorrida e nem na velocidade média entre as idades, contudo esses achados nos níveis de DA e seus metabólitos podem estar relacionados com a diminuição da exploração vertical (levantar) e da frequência de *grooming* observado no CA e LCE nas ratas com 12 e 18 meses de idade.

A DA não está relacionada somente a disfunções motoras, como comentado anteriormente; está envolvida também com distúrbios emocionais e cognitivos. Esse neurotransmissor parece desempenhar efeito direto na formação da memória no hipocampo, uma vez que estudos em roedores têm demonstrado sua participação na memória espacial e na potenciação de longa duração (ROSSATO et al., 2009; SILVA et al., 2012). Dentre os principais receptores dopaminérgicos envolvidos no processo de formação e recuperação da memória, destacam-se os receptores D1 e D5 (SILVA et al., 2012; ZARRINDAST et al., 2012). Recentemente, um estudo mostrou que na região CA1 do hipocampo, ambos os receptores D1 e D5 são importantes para a consolidação da memória no teste de RO e na esquiwa passiva (FURINI et al., 2014). Assim, considerando o prejuízo no RO e redução dos níveis de DA observado no presente estudo, podemos sugerir a participação desse sistema de neurotransmissão na formação e/ou manutenção da memória episódica. Além disso, nesse caso, podemos ainda salientar principalmente o envolvimento dos receptores D1, uma vez que estudos de neuroimagem em seres humanos mostraram diminuição no número destes receptores com o aumento da idade (WANG et al., 1998), o que pode ter contribuído para tal prejuízo observado no teste de RO nas ratas de meia-idade e senescentes.

Ainda, com relação à análise neuroquímica no hipocampo, nossos resultados mostraram diminuição dos níveis de NA, bem como aumento do seu *turnover* (VMA/NA) em ratas com 12 e 18 meses de idade. Sabe-se que a NA é essencial para a aquisição e consolidação da memória de curto prazo, além de intermediar a memória de longo prazo em regiões do hipocampo e córtex (GIBBS, 2008). Dessa forma, é plausível especular que o prejuízo na memória e aprendizado observado nas ratas com 12 e 18 meses de idade, seja decorrente da participação do sistema noradrenérgico, além do sistema dopaminérgico. Assim, fica evidente que a diminuição dos níveis de neurotransmissores, principalmente das catecolaminas (DA e NA), pode indicar redução funcional da atividade encefálica durante o envelhecimento.

A interação entre os estímulos inibitórios e excitatórios desencadeados pelos sistemas GABAérgico e glutamatérgico são fundamentais para o desenvolvimento, bem como para a manutenção do aprendizado e da memória (KALUEFF; NUTT, 1996; FOSTER; KEMP, 2006). Sabe-se, por exemplo, que

agonistas e antagonistas GABAérgicos interferem no processo de memória e aprendizado; o muscimol, um agonista do receptor GABAérgico, administrado no córtex pré-frontal de ratos, causou prejuízo no aprendizado observado no labirinto radial de oito braços (LEE; SOLIVAN, 2008), enquanto, o antagonista dos receptores GABA-B (SGS742), em roedores jovens e primatas não-humanos favoreceu o desempenho em tarefas de esquiva ativa e memória de referência espacial no labirinto radial de oito braços (FROESTL et al., 1995; GETOVA; BOWERY, 2001; CHAN et al., 2006). Contudo, nossos resultados não mostraram diferenças nos níveis de glutamato e GABA nas diferentes regiões encefálicas estudadas.

O glutamato está envolvido em uma série de funções que são modificadas com o passar da idade, entre elas o aprendizado e a memória (Zahr et al., 2008; Zahr et al., 2013), bem como a função motora (Schmidt; Bubscher; Hauber, 1992; Zahr et al., 2013). Além disso, a ativação excessiva dos receptores de glutamato pode contribuir para a degeneração neuronal e o surgimento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, doenças psiquiátricas e depressão (Mattson, 2008). Estudos em roedores mostraram relação entre o aumento da idade (30 meses) e declínio na concentração de glutamato em todo encéfalo através de cintilografia líquida (De Koning-Verest, 1980). No entanto, no presente estudo, não observamos diferenças nos níveis de glutamato em nenhuma das regiões encefálicas analisadas, evidenciando que no envelhecimento natural ocorre primeiramente diminuição nos níveis de monoaminas.

Dentre os PUFA's analisados, o DHA apresenta distintas funções no SNC, destacando-se o seu envolvimento na memória (Gamo et al., 1999) e na neuroproteção, por meio das neuroprotectinas (Rodríguez de Turco et al., 2002). Sabe-se que a deficiência dos níveis de DHA afeta principalmente o córtex e o hipocampo (Hashimoto; Hossain, 2011), estando, desse modo, amplamente relacionado com o declínio cognitivo que ocorre no envelhecimento natural (Beydoun et al., 2007) e na Doença de Alzheimer (Schaefer et al., 2006; Bazan; Molina; Gordon, 2011). Além disso, estudos têm demonstrado que modificações na composição fosfolipídica da membrana, especificamente alterações de DHA podem prejudicar a neurotransmissão sináptica de diferentes neurotransmissores, bem como influenciar na

plasticidade sináptica, porém, estudos que avaliem a relação entre os hidróxidos de DHA e a memória, ainda são escassos (AÏD et al., 2003; CHALON, 2006; TANAKA et al., 2012). Com relação aos níveis de hidróxidos do DHA, não encontramos diferenças significantes no perfil destes. Contudo, vale a pena comentar que observamos predominância do isômero 4 HDoHE no CPF, corroborando achados anteriores de que este é o isômero majoritário do DHA no encéfalo (KIM et al., 1990; APPOLINÁRIO et al., 2011). Entre os HDoHE menos abundante no presente estudo, observamos o isômero 19 (HDoHE), que é formado pela oxidação não-enzimática, mediado principalmente pelo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) em amostras biológicas (NIKI et al., 2005; APPOLINÁRIO et al., 2011). Nesse sentido, estudos que avaliem estes isômeros do DHA em modelo animal de senescência podem contribuir para identificação das vias (enzimática e não enzimática), produtos formados e possíveis efeitos biológicos.

O AA é um dos principais PUFA encontrado no hipocampo e desempenha importantes funções no SNC, tais como na plasticidade sináptica, fluidez da membrana, na sinaptogênese, na neurogênese e na transdução de sinal (MCGAHON; CLEMENTS; LYNCH, 1997). Tais funções podem ser mediadas por diferentes vias de sinalização diretamente pela ação do AA ou por meio dos seus metabólitos (SHIMIZU; WOLFE, 1990). No tecido nervoso, a principal rota enzimática para o metabolismo do AA livre é a 12/15 LOX, que é encontrada principalmente em neurônios e células da glia no cerebelo, nos gânglios basais e no hipocampo, gerando como metabólitos 12 (s) e 15 (s) HETE (NISHIYAMA et al., 1992; NISHIYAMA et al., 1993). Esses metabólitos parecem desempenhar papéis como segundos mensageiros na transmissão sináptica e por esse motivo podem estar envolvidos no processo de aprendizado e memória (PIOMELLI et al., 1987; RUEHR; ZHANG; DORMAN, 1997). Sabe-se que o AA livre pode ativar a proteína quinase e canais iônicos, bem como inibir a recaptação dos neurotransmissores e consequentemente melhorar a transmissão sináptica (KATSUKI; OKUDA, 1995). Desse modo, é plausível sugerir que a diminuição dos isômeros 12 HETE e 15/14 HETE, possam estar relacionados diretamente ou indiretamente com o prejuízo cognitivo, bem como com a diminuição dos neurotransmissores observado nos animais com 18 meses de idade. Além disso, vale a pena comentar que a diminuição dos isômeros 12 HETE e 15/14 HETE pode ser decorrente de uma maior conversão em produtos

pró-inflamatórios, uma vez que o AA ao sofrer ação da COX ou da LOX, gera consequentemente uma série de eicosanoides envolvidas no processo pró-inflamatório (THOMAS et al., 2016). Nesse sentido, a investigação das implicações dos níveis dos hidróxidos do AA, bem como a sua captação e liberação no envolvimento do prejuízo cognitivo espontâneo em modelos animais, mostra-se importante em estudos futuros.

Em suma, nossos resultados mostraram aumento do comportamento tipo-ansioso, prejuízo na memória tipo episódica e espacial, bem como redução nos níveis de neurotransmissores, em especial a dopamina, em ratas com 12 e 18 meses de idade. Ainda observamos diminuição do perfil do 12 HETE e do 15/14 HETE do AA, o que pode ter contribuído diretamente ou indiretamente para a diminuição dos níveis das monoaminas e o prejuízo cognitivo observado nos animais senescentes. Desse modo, podemos sugerir que ratas Wistar a partir de 12 meses de idade podem ser utilizadas como modelo para melhor compreender os mecanismos envolvidos no envelhecimento, bem como avaliar a eficácia terapêutica de possíveis fármacos que possam melhorar a resposta cognitiva na senescência.

CONCLUSÕES

1.7 CONCLUSÕES

Os estudos realizados em ratas com diferentes idades mostraram que:

- Não houve diferença na atividade motora observada no campo aberto, porem houve diminuição da exploração vertical (levantar) e de *grooming* em ratas com 12 e 18 meses de idade;
- Houve aumento do comportamento tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado, bem como na caixa claro-escuro em ratas com 12 e 18 meses de idade;
- Houve prejuízo na memória tipo episódica observada no teste de reconhecimento de objetos, bem como na memória espacial observada no labirinto Barnes em ratas com 12 e 18 meses de idade;
- Houve diminuição nos níveis séricos de estradiol em ratas com 18 meses de idade;
- Houve diminuição nos níveis de monoaminas e seus metabólitos em diferentes regiões encefálicas, em ratas com 12 e 18 meses de idade;
- Houve diminuição nos níveis dos hidróxidos 12/15 e 12 do ácido araquidônico em ratas com 18 meses de idade.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO PROLONGADA (90 DIAS) DE ISOFLAVONAS (ISOs) EM RATAS COM 12 MESES DE IDADE

2.1 INTRODUÇÃO

Fitoestrógenos são polifenóis naturais encontrados nas plantas, os quais apresentam estrutura química semelhante ao 17 β -estradiol, desempenhando muitas propriedades fisiológicas semelhante aos estrógenos (MUELLER, 2002; DIXON, 2004; SONI et al., 2014). Esses compostos são encontrados em frutas, verduras, legumes, grãos e especialmente em linhaça, trevo e produtos à base de soja (KURZER; XU, 1997). Há três principais classes de fitoestrógenos de interesse clínico: as isoflavonas (presente principalmente em derivados de soja e trevo); lignanas (encontradas em grande quantidade nas sementes de linhaça) e coumestanos (derivados de plantas que brotam como alfafa) (KURZER; XU, 1997; CARDOSO; BÃO, 2007; LUND et al., 2011).

O grande interesse nesses compostos é que estes podem interagir com receptores de estrógenos (REs) e, conseqüentemente, promover respostas estrogênicas. Nesse sentido, quando os níveis de estrógenos endógenos circulantes são altos, durante o ciclo menstrual ou na fase da pré-menopausa, os fitoestrógenos podem agir como antagonista dos REs. No entanto, quando os níveis de estrógenos são baixos, como, por exemplo, em homens e em mulheres na pós-menopausa, os fitoestrógenos podem agir como agonistas dos REs (KUIPER. et al., 1998; THAM; GARDNER; HASKELL, 1998; PILŠÁKOVÁ; RIEČANSKÝ; JAGLA, 2010).

Estudos em modelos animais e clínicos tem demonstrado que o uso de fitoestrógenos apresentam uma série efeitos farmacológicos que variam desde a prevenção de doenças crônicas como cânceres hormônio-dependente (LIMER; SPEIRS, 2004; CASSIDY et al., 2006; SIRIWARDHANA et al., 2013), doenças cardiovasculares (SACKS et al., 2006), osteoporose (ATMACA et al., 2008), além de aliviar os sintomas da menopausa (LUND et al., 2001; CHENG et al.,

2007; BELLOU et al., 2012). Além desses benefícios, mais recentemente, estes compostos têm ganhado destaque na melhora da resposta cognitiva e, dentre os fitoestrógenos, destacam-se as isoflavonas (ISOs).

As ISOs têm sido amplamente empregada como alternativa terapêutica para o alívio dos sintomas da menopausa. No entanto, estudos pré-clínicos e clínicos que avaliem os efeitos comportamentais e neuroquímicos do uso repetido desse fitoestrógeno, ainda, são escassos. Dessa forma, investigar os efeitos do extrato de isoflavona em modelos animais que estão iniciando o processo de senescência reprodutiva e apresentam déficit cognitivo espontâneo, podem contribuir não apenas para a consolidação deste tema envolvendo fitoterápicos e menopausa, mas também para políticas públicas relacionadas à saúde e qualidade de vida de mulheres nesta fase da vida.

2.1.1 A soja (*Glycine max*): ISOFLAVONA

A soja é uma leguminosa nativa da Ásia Oriental, pertence à Família Fabaceae (Leguminosae); Subfamília: Faboideae; Gênero: *Glycine*; e Espécie: *Glycine max*. A planta é classificada como uma semente oleaginosa e seus grãos contêm quantidades significativas de ácido fítico, ácido alfa-linolênico e ISOs (MARTINEZ et al., 2011; AHMAD et al., 2014).

A soja é um alimento praticamente completo, uma vez que contém cerca de 36 a 46% de proteínas de alta qualidade, aproximadamente 20% de lipídios e 30% de carboidratos, micronutrientes (ferro, cálcio e zinco), minerais e teores consideráveis de vitaminas do complexo B (MORAES et al., 2006; CEDERROTH; NEF, 2009; MARTINEZ et al., 2011).

As ISOs constituem uma importante classe de compostos polifenólicos e pertencem ao grupo dos flavonoides; são sintetizadas a partir da via dos fenilpropanoides e fazem parte do metabolismo secundário dos vegetais (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003). Os flavonoides, de forma geral, apresentam-se oxigenados e também conjugados com açúcares. Quando conjugados, são denominados heterosídeos, os quais podem ser O-heterosídeos, quando a ligação ao açúcar é estabelecida por uma hidroxila, ou C-heterosídeos quando

essa ligação é feita por um átomo de carbono. À molécula livre, ou seja, sem o açúcar é chamada aglicona ou genina (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

A estrutura geral das ISOs compreende dois anéis benzênicos (anéis A e B), unidos por um anel heterocíclico (C) (Figura 2.1), diferindo dos demais componentes do grande grupo dos flavonoides pela posição da ligação entre o anel B e C (RIMBACH et al., 2008). As diferentes possibilidades de ligações desses anéis são responsáveis pela diversidade química desses compostos, sendo conhecidas mais de 370 moléculas de ISOs agliconas (RIMBACH et al., 2008).

Figura 2.1. Estrutura química das isoflavonas mostrando os anéis benzênicos (A e B) unidos por um anel heterocíclico (C) e de diferentes compostos.

Fonte: Sandini (2017), Adpatado de Rimbach et al., (2008), Chandrasekhara, Aglin, (2013).

O grande interesse nesses compostos é que as ISOs apresentam fórmula estrutural e peso molecular semelhante aos hormônios estrogênicos (MUELLER, 2002; DIXON, 2004) (Figura 2.2). As características que conferem similaridade entre esses compostos são a presença do anel fenólico, imprescindível para que haja ligação com o receptor, o peso molecular e a distância equivalente de 11,5 Å entre as hidroxilas 4' e 7 (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000; CHOI et al., 2008).

Figura 2.2. Estrutura química da isoflavona e do estradiol

Fonte: Sandini (2017).

Os grãos de soja contêm três principais ISOs que se apresentam em quatro diferentes formas: glicosiladas (daidzina, genistina e glicetina) quando há um carboidrato ligado na posição 7 do anel A por meio de ligações β -D-glicosídicas; formas acetilglicosiladas (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicetina) e malonilglicosiladas (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicetina), nas quais estes carboidratos encontram-se esterificados através de um grupo acetil ou malonil na posição 6"; e as formas agliconas (daidzeína, genisteína e gliciteína), que não encontram-se conjugadas com moléculas de glicose. Portanto, há 12 isômeros de ISOs (MURPHY; FARMAKALIDIS; JOHNSON, 1982).

As formas glicosiladas daidzina e genistina são as principais formas encontradas nos grãos de soja, constituindo cerca de 50 a 90% das ISOs (ELDRIDGE, 1982). Entretanto, as agliconas daidzeína e genisteína, que estão presentes em menor quantidade na soja, são as formas que possuem maior atividade biológica e, conseqüentemente, maior interesse científico (DIXON, 2004; PILŠÁKOVÁ; RIEČANSKÝ; JAGLA, 2010). Ressalta-se que a proporção das formas conjugadas e não conjugadas (aglicona) varia entre os diferentes alimentos, por exemplo, os alimentos fermentados à base de soja apresentam quantidades superiores de agliconas em relação aos produtos não fermentados (PATISAUL; JEFFERSON, 2010).

Com relação a quantidade de ISOs presente nos grãos de soja, estas variam conforme variedade da planta, fatores genéticos e ambientais, além do processo de extração a que são submetidas (ZHU et al., 2005; CARRÃO-PANIZZI et al., 2009; TEEKACHUNHATEAN; HANPRASERTPONG;

TEEKACHUNHATEAN, 2013). No que diz respeito a estrutura do grão, as ISOs não estão presentes no tegumento da semente ou são detectadas apenas em pequenas quantidades (KUDOU et al., 1991). Já, o teor de ISOs totais é de 5,5 a 6,0 vezes maior no hipocótilo da semente que nos cotilédones. Porém, 80 a 90% do total de ISOs dos grãos estão localizados nos cotilédones, considerando que o hipocótilo corresponde a 2% do peso seco da semente (TSUKAMOTO et al., 1995).

Sabe-se que as ISOs podem ser dissociadas da proteína da soja usando extração alcoólica, processo que diminui significativamente a quantidade de ISOs ligadas (BHATHENA; VELASQUEZ, 2002). Esse fato, explica a variabilidade substancial no conteúdo destas, em produtos contendo soja (0,1 a 5 mg de isoflavonas /g de proteína na farinha de soja e proteína texturizada; 0,3 mg de isoflavonas /g de proteína na soja verde e no tofu e 0,25 a 40 mg de isoflavonas/g de proteína em uma porção de alimentos tradicionais) (WANG; MURPHY, 1994). Enquanto tofu, proteína de soja isolada e algumas preparações de leite de soja fornecem 0,1-2 mg de isoflavonas/g de proteína de soja (BHATHENA; VELASQUEZ, 2002)

2.1.2 Farmacocinética das ISOs

As ISOs provenientes da dieta são absorvidas no trato gastrointestinal somente após a desglicosilação para a forma aglicona (DAY et al., 2000; CHANDRASEKHARAN; AGLIN, 2013).

A conversão das ISOs glicosiladas (genistina e daidzina) para agliconas ativas (genisteína e daidzeína) tem início na cavidade oral, com o auxílio da microbiota e do epitélio oral, por meio da enzima β -glicosidase (WALLE et al., 2005). No intestino delgado superior, a conversão para aglicona continua pela ação da lactase florizina hidrolase (WILKINSON et al., 2003), β enterócito glicosidase (DAY et al., 2010) e pela β -glicosidase (ROWLAND et al., 2003). Esse processo pode variar entre indivíduos devido às diferenças inter-individual e raciais, principalmente no que diz respeito a atividade da enzima lactase florizina hidrolase (BECK; ROHR; JUNGBAUER, 2005).

Após a desglicosilação, a daidzina é biotransformada em daidzeína e, então, em dihidrodaidzeína, e em seguida, em O-desmetil-angolensina (O-DMA) e equol, principal metabólito ativo das ISOs (YUAN; WANG; LIU, 2007; MATTHIES et al., 2008). A genisteína é biotransformada em genisteína, posteriormente em dihidrogenisteína e, então, em 6-hidroxi-O-DMA que produz 1,3,5 trihidroxibenzeno e ácido 4 hidroxifenil 2 propiônico (SETCHELL; BROWN; LYDEKING-OLSEN, 2002; CHANDRASEKHARAN; AGLIN, 2013) (Figura 2.3). Além disso, outras ISOs presentes na soja, como a biochanina A e formononetina, também podem sofrer desmetilação no trato gastrointestinal originando genisteína e daidzeína, respectivamente (TOLLESON et al., 2002).

Figura 2.3. Biotransformação da genisteína e daidzeína

Legenda: O-desmetil-angolensina (O-DMA)

Fonte: Sandini (2017), Adpatado de Chandrasekhara, Aglin, (2013).

Ressalta-se que a estrutura da ISO parece influenciar o metabolismo microbiano, uma vez que as ISOs com hidroxilas na posição 5, 7 ou 4 podem ser mais suscetíveis ao metabolismo microbiano do que aquelas sem substituições hidroxila nestas posições (SIMONS et al., 2005). Desse modo, o tipo e número de substituintes presentes na estrutura química das ISOs podem influenciar

diretamente a atividade biológica, bem como a biodisponibilidade destes compostos (LEE; CHOU, 2006). Além disso, a clivagem microbiana do anel-C das ISOs produz metabólitos de deoxibenzoina, que são absorvidos e apresentam atividade biológica semelhante às ISOs (HUR et al., 2002; SCHOEFER et al., 2002).

O equol é obtido exclusivamente pela ação de bactérias intestinais sobre a daidzeína, ou seja, não é encontrado em alimentos de origem vegetal. Sabe-se que este, é biotransformado de maneira diferente entre os indivíduos, sendo que aproximadamente 30 a 50% da população que faz uso de uma dieta a base de soja, apresenta a capacidade de biotransformar o equol, e cerca de 80 a 90% podem biotransformar o O-DMA. Dessa forma, a capacidade para biotransformar a daidzeína a equol parece ser maior em populações que consomem diariamente alimentos à base de soja. Sendo assim, acredita-se que, indivíduos produtores de equol podem ser mais beneficiados do que os não-produtores, uma vez que este metabólito apresenta maior atividade estrogênica do que o seu precursor (SETCHELL; CLERICI, 2010; MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012). Com relação aos roedores, o equol é o maior metabólito circulante dentre as ISOs, representando 70 a 80% de todas as ISOs circulantes (CEDERROTH; NEF, 2009).

De modo geral, após o consumo, as ISOs glicosiladas são rapidamente desglicosiladas, absorvidas e biotransformadas no fígado e pelos enterócitos intestinais, e entram na circulação sistêmica predominantemente como conjugados com biodisponibilidade limitada (CHANDRASEKHARAN; AGLIN, 2013). No fígado ocorre a conjugação das ISOs, sendo a maior parte conjugada com ácido glicurônico (95%) e em menor quantidade com o sulfato (5%) (LUNDHT, 1995). Apenas 1 a 3% de ISOs na forma aglicona atingem a circulação sistêmica (PATISAUL; JEFFERSON, 2010; WAHAJUDDIN et al., 2013). Desse modo, o metabolismo de primeira passagem das ISOs (genisteína e daidzeína) é muito elevado (>90%), antes de entrarem na circulação geral (CHANDRASEKHARAN; AGLIN, 2013).

Em seres humanos, o tempo para atingir concentrações plasmáticas máximas (T_{max}) de genisteína e daidzeína é de aproximadamente 5,2 e 6,6 horas, respectivamente (SETCHELL et al., 2002). Já para as formas glicosiladas correspondentes, o T_{max} é de 9,3 e 9,0 horas, respectivamente, indicando que

a hidrólise inicial da molécula é uma etapa importante para a absorção das ISOs; esse aumento no tempo se deve principalmente a clivagem hidrolítica do radical glicosídico necessária para que ocorra a biodisponibilidade (SETCHELL et al., 2001). A biodisponibilidade sistêmica, da genisteína (ASC média = 4,54 µg/mL.h) é maior do que a de daidzeína (ASC média = 2,94 µg/mL.h) (SETCHELL et al., 2002).

As ISOs são rapidamente distribuídas a todos os tecidos e atravessam a barreira placentária, bem como a hematoencefálica (TODAKA et al., 2005; PILŠÁKOVÁ; RIEČANSKÝ; JAGLA, 2010; DOERGE, 2011). O volume de distribuição (Vd) da daidzeína parece ser maior do que a da genisteína (SETCHELL et al., 2003). Em um estudo com mulheres na pré-menopausa utilizando ISOs, verificou-se que o volume médio de distribuição normalizada para biodisponibilidade, taxa de depuração e meia-vida da daidzeína [¹³C] foram 336,25 L, 30,09 L/h e 7,75 h, respectivamente; os valores correspondentes para a genisteína [¹³C] foram 258,76 L, 21,85 L/h, e 7,77 h (SETCHELL, et al., 2003). No entanto, outro estudo apontou que o tempo de meia-vida para a daidzeína e genisteína foi relatado ser de 9,3 e 7,1 h, respectivamente, indicando que as ISOs ou seus metabólitos são rapidamente excretados (CEDERROTH; NEF, 2009). Ressalta-se que alguns fatores podem influenciar a biodisponibilidade das ISOs, como a microbiota intestinal, a dose administrada, o tempo do trânsito intestinal e a composição química das ISOs, bem como o consumo diário destas (CEDERROTH; NEF, 2009).

A principal via de excreção das ISOs é a urinária (10 a 60%) e varia conforme a sua forma, como, por exemplo, a excreção da daidzeína é maior do que a da genisteína e da gliciteína (WATANABE et al., 1998; SHELNUTT et al., 2000). A excreção urinária das ISOs ocorre principalmente com conjugados glicurônicos (70 a 90%), seguido de conjugado sulfato (10 a 25%) e de forma aglicona (1 a 10%) (SHELNUTT et al., 2000). O pico de excreção urinária, após uma refeição rica em ISOs é em torno de 7 a 8 h (WATANABE et al., 1998), no entanto, na maioria das vezes, a excreção ocorre dentro de 24 h após a última refeição (SETCHELL, et al., 2003). Com relação à excreção fecal das ISOs, menos de 5% são eliminados por essa via, sendo predominante a eliminação na forma não conjugada (aglicona) e inferior a 10% na forma conjugada (LARKIN; PRICE; ASTHEIMER, 2008).

2.1.3 Efeitos biológicos das ISOs

Como mencionado anteriormente, o grande interesse nesses compostos se deve principalmente à sua similaridade estrutural ao 17 β -estradiol, o estrógeno mais abundante na circulação sanguínea. Sabe-se que os estrógenos desempenham uma série de funções relacionadas ao crescimento e diferenciação das características sexuais secundárias femininas, além de efeitos no metabolismo ósseo, de lipídios e neuroproterores (COOKE; NAAZ, 2004; CEDERROTH; NEF, 2009; SONI et al., 2014). Essas ações são mediadas por duas isoformas de receptores de estrógenos, conhecidas como RE α e RE β , e por um receptor de membrana acoplado à proteína G, o GPR30 (NILSSON et al., 2001; BAI; GUST, 2009). Estes receptores são membros da superfamília de receptores intracelulares esteroides/tireoide, localizados principalmente na membrana do núcleo, promovendo efeito genômico através da ligação com receptores nucleares específicos, desencadeando efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos (BELCHER; ZSARNOVSZKY, 2001). Ambos receptores α e β exercem diferentes funções fisiológicas, que dependem da sua localização no tecido (COUSE et al., 1997). Nesse sentido, sabe-se que os RE α são predominantemente expressos no útero, hipotálamo/pituitária, ossos e outros tecidos, estando envolvido principalmente na regulação do processo reprodutivo (ENMARK; GUSTAFSSON, 1999). Os RE β são expressos principalmente no ovário, glândula mamária, sistema imune e diferentes regiões encefálicas, como, por exemplo, hipocampo, córtex entorrinal e tálamo (SHUGHRUE; MERCHENTHALER, 2001; HARRIS, 2007).

As ISOs podem interagir com ambos receptores e desencadear respostas estrogênicas ou antiestrogênicas, dependendo da dose utilizada, da concentração de estrógenos endógenos e do tecido alvo (CEDERROTH; NEF, 2009). Com relação a afinidade pelos REs, as ISOs apresentam menor afinidade de ligação aos receptores α e β , quando comparadas aos estrógenos endógenos (KUIPER. et al., 1998). Sabe-se que as ISOs apresentam maior afinidade aos RE β , cerca de 20 a 30 vezes maior do que aos RE α (KUIPER et al., 1997).

No que diz respeito ao nível circulante de estrógenos endógenos, quando estes estão em níveis elevados, as ISOs podem inibir a atividade do estrógeno, uma vez que estas competem com o estradiol pela ligação aos REs. Por outro

lado, quando os níveis circulantes de estrógenos endógenos estão baixos, a atividade estrogênica das ISOs promoverá efeitos agonistas (LEPHART; SETCHELL; LUND, 2005; PARASKEVI 2007). Por isso, as ISOs são consideradas moduladores seletivos naturais dos receptores de estrogênio (SERMs) e tem sido amplamente utilizada na terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa, com o objetivo de diminuir os sintomas causados pela menopausa, bem como prevenir o surgimento de cânceres de mama e útero (PARASKEVI 2007).

Sabe-se ainda que, os fitoestrógenos podem atuar como inibidores enzimáticos, afetando as vias da esteroidogênese. Estes compostos provocam alterações na produção de progesterona, aldosterona, hidrocortisona, testosterona e estradiol. Os flavonoides, compostos presentes nas ISOs, por meio de mecanismos competitivos, foram capazes de inibir enzimas chave nesta cascata bioquímica, como as enzimas 11 β -hidroxilase (CYP11B1 ou P45011), 17 α -hidrolase (CYP17A1 ou P450c17) e 21 hidroxilase (CYP21A1 ou P450c21) (OHNO et al., 2004). Além disso, estudos mostraram que as ISOs foram capazes de inibir a atividade da enzima 5 α redutase, que catalisa a conversão de testosterona a 5 α -dihidrotestosterona, bem como da aromatase P450, que converte a testosterona a estradiol (KAO et al., 1998; BROOKS; THOMPSON, 2005). Por outro lado, mais recentemente, um estudo *in vitro*, mostrou que uma mistura de fitoestrógenos causou aumento na produção de estradiol e diminuição a produção de testosterona, indicando uma indução da atividade da enzima aromatase (TAXVIG et al., 2009). Essa discrepância entre os estudos acima, pode ser devido as diferentes concentrações utilizadas, uma vez que, Almastrup et al., (2002) verificou inibição da atividade da enzima aromatase somente em pequenas concentrações de ISOs (<1 microM), enquanto em altas concentrações (>1 microM), observou o aumento da atividade desta enzima (ALMSTRUP et al., 2002).

Ressalta-se, ainda, que as ISOs podem desencadear efeitos via não-genômica, através da regulação de proteínas, do ciclo celular e da atividade antioxidante (KURZER; XU, 1997). Com relação a atividade antioxidante, as ISOs podem atuar diretamente através da capacidade sequestradora de radicais livres, ou indiretamente como moduladoras aumentando a atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione redutase

(SETCHELL; CASSIDY, 1999; LIU; CHANG; WIESENBERN, 2005; SETCHELL; CLERICI, 2010). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que as ISOs foram capazes de inibir a peroxidação lipídica, bem como sequestrar radicais peróxido em um ambiente hidrofílico (RÜFER; KULLING, 2006; IBRAHIM et al., 2008). Ressalta-se que a capacidade antioxidante das ISOs está associada ao número de hidroxilas livres no anel e segue a seguinte ordem: genisteína > daidzeína > genistina > daidzina (RUIZ-LARREA et al., 1997).

No que diz respeito a atividade via ciclo celular e a regulação de proteínas, verificou-se que a genisteína atua inibindo a topoisomerase II, bem como a proteína tirosina quinase e, conseqüentemente, interferindo com a progressão do ciclo celular (SCHMIDT et al., 2008). Além disso, verificou-se que a genisteína, bem como a daidzeína foram capazes de inibir a proliferação de células cancerígenas através do bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G2/M (CHOI; KIM, 2008; OUYANG et al., 2009). Dessa forma, ambos compostos têm sido utilizados experimentalmente como possíveis agentes terapêuticos no tratamento de cânceres, principalmente hormônio-dependente.

2.1.4 ISOs e menopausa

Com o aumento da expectativa de vida, as mulheres passaram a experimentar mudanças físicas, fisiológicas e sociais, o que muitas gerações anteriores não conseguiram vivenciar. Entre essas alterações se destacam as provocadas pela redução dos hormônios reprodutivos que culmina no climatério e conseqüentemente na menopausa.

O climatério é um processo natural que ocorre devido à redução ou perda da atividade folicular do ovário, que culmina na queda progressiva na secreção de estradiol, causando uma série de mudanças no organismo das mulheres (LORENZI et al., 2009). O climatério é definido como o período que antecede a menopausa e o período pós-menopausa, uma vez que a menopausa se refere ao último ciclo menstrual e só pode ser confirmada após doze meses sem a ocorrência de menstruação – amenorreia (DAVIS et al., 2015).

Os sintomas do climatério são geralmente classificados em três grandes grupos: somáticos, psicológicos e urogenitais. Com relação aos sintomas somáticos, destacam-se os vasomotores (ondas de calor ou fogachos) e a

sudorese noturna que são marcantes no climatério, acometendo cerca de 30 a 75% das mulheres dos países desenvolvidos (GARTOULLA et al., 2014). A fisiologia de ambos sintomas ainda não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que ocorra uma insensibilidade hipotalâmica aos estrógenos (DAVIS et al., 2015). Os sintomas psicológicos geralmente são acompanhados por distúrbios decorrentes do humor e do sono, irritabilidade, dificuldade de concentração, diminuição da função cognitiva e depressão (AL-SAFI; SANTORO, 2014; DAVIS et al., 2015). Os sintomas urogenitais estão relacionados às alterações físicas dos genitais, como secura vaginal, desconforto, prurido, dispareunia (cópula difícil ou dolorosa) e diminuição da libido (MISHRA; DOBSON, 2012; NAPPI; KOKOT-KIEREPA, 2012; AL-SAFI; SANTORO, 2014).

Ressalta-se, ainda, que o envelhecimento natural do ovário tem como consequência o desequilíbrio metabólico que apresenta efeitos diretos e indiretos sobre o sistema nervoso. Sabe-se que o declínio hormonal no climatério, aumenta a predisposição à hipertensão arterial, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, obesidade, além de alterar a função cognitiva, principalmente em aspectos associados a memória e fluência verbal (DAVIS et al., 2015).

Desse modo, na tentativa de prevenir e minimizar o impacto destes sintomas que afetam a qualidade de vidas das mulheres, tem se recorrido à terapia de reposição hormonal. No entanto, a segurança quanto ao uso desta terapia é questionada, uma vez que os riscos excedem os benefícios. Dessa forma, na tentativa de minimizar os riscos provenientes da terapia estrogênica, vem se destacando como uma alternativa à terapia de reposição hormonal tradicional, o uso das ISOs.

A reposição hormonal com ISOs ou com seus princípios ativos tem sido eficaz no controle dos sintomas somáticos do climatério (CRISAFULLI et al., 2004; YE et al., 2012; CHEN; LIN; LIU, 2015). Além disso, outros estudos apontam efeitos benéficos das ISOs no perfil lipídico, nos ossos, na diminuição de tecido adiposo branco e na proteção contra doenças cardiovasculares, além de produzir efeitos ansiolíticos e aliviar os sintomas da depressão (WANGEN et al., 2001; CANO; GARCÍA-PÉREZ; TARÍN, 2010; BLAKE et al., 2011; LAGARI; LEVIS, 2014; HIROSE et al., 2016). Além disso, estudos experimentais

mostraram que as ISOs têm importância dermatológica, uma vez que foi capaz de aumentar a quantidade de colágeno e, conseqüentemente, sendo eficaz na prevenção do envelhecimento da pele causada pela diminuição de estrógeno (CIRCOSTA et al., 2006). Num estudo conduzido em mulheres durante a pós-menopausa, verificou que o uso das ISOs por via tópica causaram efeitos positivos sobre o tropismo cutâneo, porém, os estrógenos apresentaram efeito mais evidente sobre os parâmetros histomorfométricos, quando comparado às ISOs (MORAES et al., 2009). Mais recentemente, um tratamento subcutâneo a longo prazo com genisteína (12 semanas), em ratas ovariectomizadas, mostrou que está apresenta os mesmos efeitos benéficos que a reposição com estrógeno, no que diz respeito aos problemas de pele associados a menopausa (POLITO et al., 2012).

Sabe-se que, o declínio cognitivo e prejuízo nas habilidades motoras surgem mais precocemente na mulher do que no homem, fato este que pode ser atribuído ao declínio do estrógeno a partir do climatério (HENDERSON, 2011). Recentemente, um estudo mostrou que mulheres na pós-menopausa apresentaram desempenho significativamente pior do que as mulheres na pré- e peri-menopausa em tarefas de memória verbal e significativamente pior do que mulheres na peri-menopausa em tarefas de fluência verbal fonêmica (WEBER; MAKI; MCDERMOTT, 2014), evidenciando efeitos negativos sob a memória verbal na ausência do estrógeno. Dessa forma, o uso das ISOs tem ganhado grande destaque devido à sua atuação na resposta cognitiva, uma vez que o envelhecimento parece ser um importante fator relacionado com a diminuição da expressão e da distribuição de REs, principalmente dos RE β no hipocampo e CPF, estruturas importantes relacionada com a memória e aprendizado (KEENAN et al., 2001; WILSON et al., 2002; FRICK, 2009).

A administração a longo prazo de soja ou preparações de ISOs isoladas utilizadas como uma alternativa terapêutica de reposição hormonal, mostraram melhora na aprendizagem, raciocínio lógico e capacidade de planejamento em mulheres na pós-menopausa (DUFFY; WISEMAN; FILE, 2003; KREIJKAMP-KASPERS et al., 2007; CHEN; LIN; LIU, 2015). Mesmo a curto prazo, o consumo de soja (> 170 mg de ISOs, durante 7 dias consecutivos) em mulheres jovens saudáveis, mas não em homens, melhorou significativamente a habilidade de rotação mental (PILSÁKOVÁ L et al., 2009). Por outro lado, um estudo realizado

com mulheres saudáveis na pós-menopausa, mostrou que a suplementação de soja a longo prazo em uma dose similar as dietas tradicionais asiáticas (25 mg/kg), não apresentou nenhum efeito global sobre a cognição, mas foi capaz de melhorar a memória visual (HENDERSON et al., 2012). Em outro estudo conduzido em mulheres entre 45 e 60 anos de idade, que receberam 200 mg de ISO diariamente, durante 2 anos, não mostrou efeito preventivo na perda óssea e nos sintomas de menopausa (LEVIS et al., 2011). Além disso, tratamentos longos, com duração entre 6 e 12 meses, em mulheres com idades entre 56 e 76 anos não mostraram relação entre o consumo diário de ISO e melhora na função cognitiva (HO et al., 2007; KREIJKAMP-KASPERS et al., 2007). No mesmo sentido, um estudo mostrou não haver relação entre a melhora da função cognitiva e a excreção urinária de ISOs em mulheres na pós-menopausa (JOHN et al., 2014). Dessa forma, embora vários estudos apontem efeitos benéficos da suplementação com ISOs sobre os sintomas da menopausa, os resultados ainda são inconclusivos, principalmente no que diz respeito à função cognitiva.

Os estudos em modelos animais com ratas ovariectomizadas, visando mimetizar a menopausa, mostraram que o tratamento com ISOs foi capaz de melhorar a resposta cognitiva em tarefas hipocampo-dependentes ou não (ALONSO et al., 2010; BAGHERI et al., 2011; SAFAHANI et al., 2011). No entanto, estudos conduzidos com ratas com 16 meses de idade mostraram que o tratamento com genisteína prejudicou o desempenho em tarefa que avalia a memória de trabalho (NEESE et al., 2010) e, posteriormente, associaram esse prejuízo a administração múltipla diária da genisteína (NEESE et al., 2012). Mais recentemente, um estudo realizado somente com o equol mostrou que o tratamento repetido diário deste metabólito não alterou os processos de aprendizagem e memória em ratas ovariectomizadas (NEESE et al., 2014).

Dessa forma, fica evidente que os resultados ainda são insuficientes para permitir conclusões definitivas em relação ao uso de ISOs *in vivo* para prevenção e/ou tratamento de disfunções cognitivas. Assim, considerando que a maioria dos estudos em roedores foi realizado em animais jovens ovariectomizados, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos comportamentais, neuroquímicos e anatomopatológicos da exposição prolongada às ISOs em ratas que estão em processo natural de déficit cognitivo (12 meses de idade).

OBJETIVOS

2.2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito comportamental, a análise sérica bioquímica e de estradiol, os níveis de neurotransmissores encefálicos e achados anatomopatológicos em ratas de meia-idade (12 meses de idade) tratadas com diferentes doses de isoflavonas durante 90 dias.

2.2.1 Objetivos Específicos

Estudar o efeito do tratamento prolongado (90 dias) de diferentes doses de ISOs em ratas de meia-idade, avaliando:

- os sinais clínicos de toxicidade, o consumo de água e de ração, e mensuração do peso corpóreo;
- a atividade motora em campo aberto;
- o comportamento tipo-ansioso no labirinto em cruz elevado e na caixa claro-escuro;
- a memória espacial no labirinto Barnes;
- a análise bioquímica sérica e de estradiol;
- o estudo anatomopatológico
- os níveis de neurotransmissores e seus metabólitos em diferentes regiões encefálicas;

MATERIAL E MÉTODOS

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Foram utilizadas ratas *Wistar*, com 12 meses de idade, provenientes do biotério do Centro de Pesquisa em Toxicologia (CEPTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), Campus de Pirassununga. Os animais foram alojados em caixas de plástico fosco com tampas metálicas, medindo 40x50x20 cm, as quais foram mantidas em salas com temperatura e umidade constantes (21-24°C e 65-70%, respectivamente), em ciclo de luz claro/escuro de 12 h, sendo a luz acessa às 6 h. Durante todo tratamento, os animais receberam água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as normas de manipulação animal adotadas pela CEUA da FMVZ/USP, sob protocolo nº 3047/2013 (Anexo 1).

2.3.2 Isoflavonas (ISOs)

O extrato seco de isoflavona 40% foi adquirido da Florien - Distribuidora de Insumos Farmacêuticos e Cosméticos, acompanhado de um laudo técnico e identificativo de Controle de Qualidade (Anexo 2). O produto foi analisado pelo fornecedor de acordo com a Farmacopeia Brasileira 4ª edição.

Para o preparo do tratamento, o extrato seco de ISOs foi dissolvido em água e tween 80% (1 gota/50 mL) para a obtenção das doses de 50 (ISO50), 100 (ISO100) e 200 (ISO200) mg/kg, este foi mantido em temperatura de aproximadamente $\pm 4^{\circ}\text{C}$. A solução controle consistiu de água e tween 80 (1 gota/50 mL). Todos os animais receberam o volume de 1 mL/kg de peso corpóreo.

As ratas foram tratadas diariamente, por via oral (gavagem) durante 90 dias, sendo que as ratas do grupo controle receberam a solução controle pelo

mesmo período e via de administração. As doses escolhidas foram empregadas de acordo com estudos prévios que mostraram melhora dos sintomas da menopausa, bem como da resposta cognitiva em mulheres na pós-menopausa (DUFFY; WISEMAN; FILE, 2003; NAHAS et al., 2007) e melhora da performance cognitiva em modelos animais ovariectomizados (LUINE et al., 2006; SAFAHANI et al., 2011). Para o ajuste da dose, bem como para monitorar a saúde dos animais, todos foram pesados a cada três dias.

2.3.3 Avaliação clínica, do consumo de água e de ração, e mensuração do peso corpóreo

A avaliação do peso corpóreo, bem como os consumos de água e de ração foram mensurados semanalmente.

Os animais foram observados diariamente, na própria gaiola moradia, quanto aos sinais de toxicidade, tais como: alteração da locomoção, alteração de mucosa, piloereção, sialorreia, hipnose, hiperexcitabilidade, contorções abdominais, tremores, diarreia, letargia e coma.

2.3.4 Avaliação comportamental

Após o tratamento, todas as ratas passaram pelo teste do campo aberto para avaliar a atividade motora, conforme descrito no material e métodos do Capítulo 1 no item 1.3.2.1; no labirinto em cruz elevado e na caixa claro-escuro para avaliar a ansiedade, conforme descrito nos itens 1.3.2.2 e 1.3.2.3 respectivamente do Capítulo 1; no labirinto de Barnes para avaliar o aprendizado e a memória, como descrito no item 1.3.2.5 do Capítulo 1.

2.3.5 Análise sérica de bioquímica e de estradiol

Para a realização da análise bioquímica do sangue, bem como para avaliação sérica de estradiol, amostras de sangue foram coletadas, sem anticoagulante, e foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos para retração do coágulo e, em seguida, estas foram submetidas à centrifugação

(4000 rpm, 10 minutos – Centrífuga Eppendorf®-5804 R) para a coleta do soro, que após foi armazenado em *ependorfs* de 2 mL e imediatamente congelados a -80°C, para então serem submetidos às diferentes avaliações bioquímicas e análise de estradiol.

As determinações dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), albumina, proteína total, glicose, triglicérides, colesterol, colesterol HDL, fosfatase alcalina (FAL), ureia e creatinina foram realizados por meio da utilização de *kits* comerciais da marca Intertek em equipamento ChemwellT, obedecendo as instruções do fabricante.

Os níveis de estradiol foram determinados pela técnica de enzima imunoensaio de duplo-anticorpo, empregando-se *kits* comerciais apropriados (Cayman Chemical®, Ann Arbor, MI, EUA, catálogo n° 582701), conforme descrito no item 1.3.3 do Capítulo 1.

2.3.6 Estudo anatomopatológico

Após a coleta das estruturas encefálicas para a análise de neurotransmissores, padronizou-se o hemisfério esquerdo para o estudo histopatológico. A seguir, realizou-se a abertura e inspeção das cavidades torácica e abdominal e os seguintes órgãos foram retirados e pesados: fígado, pulmões, adrenais, rins e baço. Os pesos relativos desses órgãos foram obtidos através da seguinte fórmula: peso do órgão / peso corpóreo x 100. A seguir, fragmentos representativos destes órgãos foram fixados em formol 10% tamponado, processado seguindo as técnicas de rotina para coloração por hematoxilina e eosina.

2.3.7 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos

Após a análise comportamental os animais foram decapitados com auxílio de uma guilhotina para a coleta e preparo das estruturas encefálicas conforme descrito no 1.3.4.1 do Capítulo 1, e posteriormente análise das monoaminas e dos aminoácidos conforme descrito no item 1.3.4.2 do Capítulo 1.

2.4 Análise Estatística

Para a realização das análises estatísticas, empregou-se o programa estatístico GraphPad Prism 6.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados foi utilizado o teste de Bartlett. Para avaliar o peso corpóreo, consumo de água, ração e a memória espacial no labirinto de Barnes, empregou-se Anova de duas vias (RMANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett's. Para dados paramétricos foi utilizada a análise de variância Anova de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett's. Em caso de análise não paramétrica foi utilizado Kruskal-Wallis, seguida pelo pós-teste de Dunn's. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média e respectivo erro padrão.

RESULTADOS

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Avaliação clínica, do consumo de água, ração, e mensuração do peso corpóreo

A figura 2.4 mostra o peso corpóreo, o consumo de ração e de água em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com ISO durante 90 dias. Durante o tratamento com as diferentes doses de ISOs não foram observados sinais clínicos de toxicidade.

Com relação ao peso corpóreo, a análise estatística RMANOVA não apontou diferenças significantes no tratamento ($F(3/27) = 0,3424$, $p=0,7949$), porém mostrou diferenças no tempo de tratamento ($F(12/108) = 6,314$, $p<0,001$) e interação entre os fatores ($F(36/324) = 3,145$, $p<0,0001$). O pós-teste de Dunnett's mostrou aumento do peso corpóreo nas seguintes semanas de tratamento: 2ª ($p<0,01$), 3ª ($p<0,05$), 4ª ($p<0,05$), 5ª ($p<0,01$), 8ª ($p<0,05$), 11ª ($p<0,05$), 12ª ($p<0,001$) e 13ª ($p<0,001$) em ratas do grupo ISO50. No entanto, nas ratas do grupo ISO100, o pós-teste mostrou diminuição do peso corpóreo na 9ª ($p<0,001$), 10ª ($p<0,01$), 11ª ($p<0,01$) e 13ª ($p<0,05$) semanas de tratamento *versus* ratas do grupo controle (Fig. 2.4). Com relação as ratas do grupo ISO200, o pós-teste apontou aumento do peso corpóreo na 1ª ($p<0,001$) e na 2ª ($p<0,01$) semana de tratamento quando comparada as ratas do grupo controle (Fig. 2.4).

Quanto ao consumo de ração, a análise estatística RMANOVA não apontou diferenças significantes no tratamento ($F(3/27) = 2,080$, $p=0,1264$), porém mostrou diferenças com relação ao tempo de tratamento ($F(12/108) = 14,85$, $p<0,001$) e interação entre os fatores ($F(36/324) = 1,566$, $p<0,02$). O pós-teste de Dunnett's apontou aumento do consumo de ração em ratas do grupo ISO50 na 1ª ($p<0,05$), 8ª ($p<0,001$), 10ª ($p<0,05$), 12ª ($p<0,05$) e 13ª ($p<0,001$) semanas de tratamento quando comparada as ratas do grupo controle. Além disso, houve diminuição do consumo de ração em ratas do grupo ISO200 somente na 2ª ($p<0,05$) semana de tratamento *versus* ratas do grupo controle (Fig. 2.4).

No que diz respeito ao consumo hídrico, a análise estatística RMANOVA não apontou diferenças significantes no tratamento ($F(3/27) = 1,255$, $p=0,3096$), porém mostrou diferenças no tempo de tratamento ($F(12/108) = 5,540$, $p<0,0001$), sem interação ($F(36/324) = 1,335$, $p=0,1019$). O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição no consumo de água em ratas do grupo ISO50 na 4ª ($p<0,05$), 7ª ($p<0,01$), 8ª ($p<0,05$) e 10ª ($p<0,05$) semanas de tratamento quando comparadas às ratas do grupo controle. Nas ratas que receberam 100 mg/kg de ISO, observou-se também diminuição no consumo de água na 1ª ($p<0,001$), 3ª ($p<0,01$), 5ª ($p<0,05$), 7ª ($p<0,001$), 8ª ($p<0,05$), 9ª ($p<0,01$) e 13ª ($p<0,01$) semanas de tratamento *versus* ratas do grupo controle. No que diz respeito às ratas que receberam 200 mg/kg de ISO, o pós-teste mostrou diminuição no consumo de água na 1ª ($p<0,001$), 2ª ($p<0,05$), 3ª ($p<0,001$), 4ª ($p<0,05$), 7ª ($p<0,001$), 9ª ($p<0,01$) e 13ª ($p<0,01$) semanas de tratamento *versus* ratas do grupo controle (Fig. 2.4).

Figura 2.4. Peso corpóreo (g), consumo de ração (g) e hídrico (mL) de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, $n = 10$ animais por grupo. RMANOVA seguida do pós-teste de Dunnett's: $p < 0,05$ versus ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

2.5.2 Avaliação comportamental

2.5.2.1 Avaliação da atividade geral no campo aberto (CA)

A tabela 2.1 mostra os parâmetros avaliados no campo aberto em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com diferentes doses de ISOs durante 90 dias. A ANOVA de uma via não apontou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros analisados entre os grupos. Portanto, o tratamento durante 90 dias com ISO não foi capaz de causar mudanças na atividade locomotora, bem como na exploração vertical (levantar) e no comportamento de autolimpeza (*grooming*).

Tabela 2.1. Parâmetros avaliados no campo aberto em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

Parâmetros	Controle (n=10)	ISO50 (n=10)	ISO100 (n=10)	ISO200 (n=10)
Distância percorrida (cm)	2411±143,1	2401 ± 247,7	2616 ± 225,2	2615 ± 197,1
Velocidade média (cm/s)	8,07 ± 0,47	8,05 ± 0,83	8,77 ± 0,75	8,20 ± 0,83
Tempo ZC (s)	4,20 ± 1,55	3,82 ± 1,55	3,53 ± 1,20	4,74± 1,06
Frequência de entrada ZC	2,33 ± 0,45	2,30 ± 0,70	2,30 ± 0,73	2,40 ± 0,33
Tempo ZI (s)	12,70 ± 3,15	13,60 ± 2,80	14,25 ± 3,15	9,25 ± 1,90
Frequência de entrada ZI	8,00 ± 1,25	8,70 ± 1,75	8,00 ± 1,30	7,70 ± 1,15
Tempo ZP (s)	280,9 ± 4,75	280,5 ± 3,80	279,8 ± 3,95	282,7 ± 2,90
Frequência de entrada ZP	7,00 ± 1,15	7,30 ± 1,35	9,10 ± 2,10	6,00 ± 0,77
Frequência de levantar	15,67 ± 2,60	13,40 ± 2,75	14,00 ± 2,10	17,55 ± 2,78
Frequência de <i>grooming</i>	1,30 ± 0,50	2,50 ± 0,95	1,70 ± 0,40	0,80 ± 0,32

n = número de ratas por grupo

ZC = zona central, ZI = zona intermediária, ZP = zona periférica

Anova de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: $p > 0,05$ versus ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

2.5.2.2 Avaliação da ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE)

A tabela 2.2 mostra os parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com diferentes doses de ISOs

durante 90 dias. Neste experimento, durante a análise comportamental, três ratas do grupo controle e uma rata do grupo ISO50 caíram do aparato e, por esse motivo, foram excluídas da análise estatística. Os resultados não apontaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, indicando que o tratamento durante 90 dias com diferentes doses de ISOs não modificou o comportamento tipo-ansioso.

Tabela 2.2. Parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

Parâmetros	Controle (n=7)	ISO50 (n=9)	ISO100 (n=10)	ISO200 (n=10)
% EBA ^a	53,65 ± 8,80	47,85 ± 10,40	40 ± 8,20	34,20 ± 4,80
% TBA ^a	27,40 ± 10,65	24,60 ± 10,09	26,60 ± 12	15,25 ± 3,00
Frequência de entrada BA ^b	4,15 ± 1,20	3,65 ± 1,30	2,70 ± 1,00	3,00 ± 0,70
Tempo BA (s) ^b	82,20 ± 31,95	65,65 ± 27,90	4,00 ± 0,70	6,00 ± 0,60
Frequência de entrada BF ^b	3,00 ± 0,70	3,45 ± 0,70	14,25 ± 3,15	9,25 ± 1,90
Tempo BF (s) ^b	167,7 ± 41,65	202,3 ± 34,55	211,9 ± 32,90	221,7 ± 14,6
Frequência de levantar ^b	6,00 ± 1,30	6,65 ± 1,15	7,90 ± 1,75	11,20 ± 1,55
Frequência de <i>grooming</i> ^b	1,85 ± 0,70	1,33 ± 0,30	1,30 ± 0,50	1,90 ± 0,60
Frequência de AR ^b	4,00 ± 0,90	2,55 ± 0,50	4,00 ± 0,50	3,90 ± 0,70
Frequência de HD ^b	9,40 ± 1,80	8,00 ± 2,25	5,80 ± 1,90	8,20 ± 1,40

n = número de ratas por grupo

%EBA = % entrada braço aberto; %TBA = % tempo braço aberto, AR = avaliação de risco, HD = *head dipping*

^a Kruskal-Wallis seguida do pós-teste de Dunn's: $p > 0,05$; ^b ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: $p > 0,05$ versus ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

2.5.2.3 Avaliação da ansiedade na caixa claro-escuro (CCE)

A figura 2.5 mostra os parâmetros avaliados na caixa claro-escuro em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com diferentes doses de ISOs durante 90 dias. A análise estatística não apontou diferenças significantes entre os grupos, evidenciando que o tratamento com diferentes doses de ISOs durante 90 dias, não foi capaz de alterar o comportamento tipo-ansioso.

Figura 2.5. Parâmetros avaliados na caixa claro-escuro em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, n = 10 ratas por grupo.

Anova de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: $p > 0,05$ versus ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

2.5.2.4 Avaliação da memória no Labirinto de Barnes

A figura 2.6 mostra os resultados referente ao desempenho no labirinto de Barnes de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com diferentes doses de ISOs durante 90 dias.

Com relação a latência para encontrar a caixa de escape, a análise estatística RMANOVA mostrou diferenças significantes no que diz respeito ao tratamento ($F(3/27) = 12,57$, $p < 0,0001$), dias de treino ($F(4/36) = 16,19$, $p < 0,0001$), porém sem interação ($F(12/108) = 0,4103$, $p = 0,9568$) entre os fatores. O pós-teste de Dunnett's apontou diminuição da latência para encontrar a CE em todos os dias de treino, bem como no dia do teste em todas as doses

avaliadas. Dessa forma, no 1º dia de treino houve diminuição da latência para encontrar a CE em ratas que receberam 50 mg/kg, ($p<0,01$), 100 mg/kg, ($p<0,01$) e 200 mg/kg ($p<0,001$); no 2º dia de treino, houve diminuição da latência nos grupos ISO50 ($p<0,0001$), ISO100 ($p<0,01$) e ISO200 ($p<0,05$); no 3º dia essa diminuição foi observada em ratas que receberam ISO50 ($p<0,001$), ISO100 ($p<0,05$) e ISO200 ($p<0,001$); e no último dia treino, houve redução na latência em ratas que receberam 50 mg/kg e 100 mg/kg de isoflavona ($p<0,01$), bem como no grupo ISO200 ($p<0,001$) *versus* ratas do grupo controle. No dia do teste, as ratas de todos os grupos tratados (50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg) apresentaram redução na latência para encontrar a CE ($p<0,05$), quando comparada as ratas do grupo controle (Fig. 2.6).

Quanto ao número de erros para encontrar a CE, a RMANOVA não mostrou diferenças significantes com relação ao tratamento ($F(3/27) = 1,023$, $p=0,3980$), porém apontou diferenças significantes nos dias de treino ($F(4/36) = 8,271$, $p<0,001$), sem interação ($F(12/108) = 0,8567$, $p=0,5926$) entre os fatores (Fig. 2.6).

Os resultados mostraram que as ratas tratadas com as diferentes doses de ISOs durante 90 dias, apresentaram melhora na latência para encontrar a CE, porém sem diferença no número de erros.

Figura 2.6. Desempenho no labirinto de Barnes durante os dias de treino e no dia do teste em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, $n = 10$ ratas por grupo. RMANOVA seguida do pós-teste de Dunnett's: * $p<0,05$ *versus* ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

2.5.3 Análise sérica de bioquímica e de estradiol

A tabela 2.3 mostra os resultados referente aos parâmetros bioquímicos séricos de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com diferentes doses de ISOs durante 90 dias. A análise estatística não apontou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros analisados, mostrando que o tratamento durante 90 dias com diferentes doses de ISOs não causou mudanças nos parâmetros bioquímicos séricos em ratas de meia-idade.

Tabela 2.3. Parâmetros bioquímicos de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

Parâmetros	Controle (n=10)	ISO50 (n=10)	ISO100 (n=10)	ISO200 (n=10)
ALT (U/L)	51,05 ± 8,50	49,90 ± 6,25	43,95 ± 4,80	45,80 ± 6,30
AST (U/L)	251,8 ± 17,60	249,4 ± 14,75	206,3 ± 9,65	211,2 ± 12,80
GGT (U/L)	6,10 ± 1,05	6,10 ± 1,70	4,10 ± 0,90	3,10 ± 1,15
Albumina (g/dL)	3,00 ± 0,70	4,00 ± 0,25	3,55 ± 0,10	3,60 ± 0,15
Colesterol (mg/dL)	52,65 ± 2,80	45,80 ± 3,10	45,95 ± 4,45	54,10 ± 3,60
Triglicérides (mg/dL)	167,3 ± 42,95	130,7 ± 7,20	201,1 ± 13,80	106 ± 8,90
Colesterol HDL (mg/dL)	43,30 ± 6,90	32,05 ± 7,30	27,10 ± 3,30	44,15 ± 11,30
Proteína total (g/dL)	8,75 ± 0,65	7,78 ± 0,45	8,10 ± 0,30	8,30 ± 0,33
Fosfatase alcalina (U/L)	246,7 ± 59,20	220 ± 41,10	157,70 ± 21,30	201,9 ± 25,20
Creatinina (mg/dL)	0,65 ± 0,10	0,60 ± 0,08	0,70 ± 0,10	0,65 ± 0,05
Ureia (mg/dL)	51,70 ± 2,15	54,65 ± 2,15	50 ± 2,05	47,75 ± 2,60
Glicose (mg/dL)	108,5 ± 11,80	90,40 ± 5,45	105,7 ± 8,20	121,1 ± 7,55

n = número de ratas por grupo.

AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase; GGT = gama glutamiltransferase

ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: $p > 0,05$ versus ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

A figura 2.7 mostra os resultados referente a concentração sérica de estradiol em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com diferentes doses de ISOs durante 90 dias. A ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes ($F(3/36) = 8,224$, $p < 0,0003$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's apontou

aumento na concentração de estradiol em ratas do grupo ISO100 e ISO200 ($p<0,05$), quando comparada as ratas do grupo controle. Assim, o presente resultado mostrou que o tratamento com isoflavona nas doses de 100 e 200 mg/kg, durante 90 dias foi capaz de aumentar a concentração sérica de estradiol evidenciando a ação estrogênica desse composto.

Figura 2.7. Concentração sérica de estradiol (pg/mL) em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, $n = 10$ ratas por grupo. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: * $p<0,05$ versus ratas do grupo controle. Fonte: Sandini (2017).

2.5.4 Estudo anatomopatológico

A necropsia realizada nas ratas não mostrou diferenças macroscópicas dignas de nota entre os diferentes grupos.

A tabela 2.4 mostra os resultados referente ao peso relativo de órgãos (em g – peso do órgão / peso corpóreo $\times 100$) em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com diferentes doses de ISOs durante 90 dias. A Anova de uma via apontou diferenças significantes no peso relativo dos pulmões ($F(2/36) = 4,424$, $p<0,0088$) e da adrenal esquerda ($F(2/36) = 3,225$, $p<0,0342$) entre os grupos. O pós-teste de Dunnett's mostrou diminuição do peso relativo dos pulmões ($p<0,01$) nas ratas dos grupos ISO100 e ISO200, bem como no peso relativo da adrenal esquerda ($p<0,05$) em ratas que receberam a maior dose de isoflavona, quando comparada as ratas do grupo controle.

Com relação a análise histológica, houve algumas alterações nos pulmões, foi possível verificar edema pulmonar e macrófago alveolar em uma rata do grupo controle, porém verificou-se a presença de histiócito e BALT (Bronchial Mucosa Associated Lymphoid Tissue) em todos os grupos, sugerindo que este achado, pode estar associado ao aumento da idade.

Tabela 2.4. Peso relativo (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

Órgãos	Controle (n=10)	ISO50 (n=10)	ISO100 (n=10)	ISO200 (n=10)
Fígado	3,30 ± 0,07	3,26 ± 0,07	3,30 ± 0,12	3,45 ± 0,08
Pulmões	2,00 ± 0,44	1,18 ± 0,17	0,93 ± 0,17**	0,89 ± 0,07**
Baço	0,21 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,24 ± 0,06	0,25 ± 0,01
Adrenal direita	0,011 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,011 ± 0,00
Adrenal esquerda	0,012 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,011 ± 0,00	0,09 ± 0,00*
Rim direito	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,006	0,35 ± 0,008	0,36 ± 0,01
Rim esquerdo	0,37 ± 0,02	0,33 ± 0,006	0,35 ± 0,008	0,36 ± 0,007

n = número de ratas por grupo.

Anova de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: *p<0,05, **p<0,01 *versus* ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

2.5.5 Avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos

Em relação aos resultados dos neurotransmissores não foram observadas diferenças significantes nos níveis das monoaminas, bem como nos metabólitos e taxa de renovação em nenhuma das regiões encefálicas analisadas, em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com diferentes doses de ISOs durante 90 dias.

No que diz respeito a avaliação dos aminoácidos, a ANOVA de uma via apontou diferenças significantes nos níveis dos aminoácidos, glutamato ($F(3/33) = 5,818$, $p<0,0026$) e GABA ($F(3/33) = 9,339$, $p<0,0001$) no CPF (Fig. 2.8). O pós-teste de Dunnett's mostrou aumento nos níveis do glutamato e GABA ($p<0,01$) em ratas que receberam 100 e 200 mg/kg de ISOs *versus* ratas do

grupo controle. Além disso, houve diferença significativa também nos níveis dos aminoácidos, glutamato ($F(3/32) = 10.34$, $p < 0.001$) e GABA ($F(3/32) = 6.77$, $p < 0.0012$) no hipotálamo. O pós-teste mostrou aumento nos níveis de glutamato ($p < 0,01$) e GABA ($p < 0,05$) em ratas que receberam ISO200 versus ratas do grupo controle (Fig.2.8).

As tabelas 2.5, 2.6 e 2.7 mostram os resultados obtidos na análise dos neurotransmissores no hipotálamo, hipocampo e estriado respectivamente.

Figura 2.8. Níveis de glutamato e GABA (ug/g de tecido) no córtex pré-frontal (A) e no hipotálamo (B) em ratas do grupo controle e em ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias.

Nota: Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão, $n = 9-10$ ratas por grupo. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ versus ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

Tabela 2.5. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no hipotálamo de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

NT ou MB	Controle (n=09)	ISO50 (n=09)	ISO100 (n=09)	ISO200 (n=09)
DA	163,6 ± 35,35	200,9 ± 39,95	165,8 ± 43,4	163,8 ± 45,45
DOPAC	23,00 ± 4,15	40,60 ± 7,78	20,10 ± 6,30	24,10 ± 5,07
DOPAC/DA	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02
HVA	ND	ND	ND	ND
5-HT	3888 ± 102,3	4612 ± 1039	3366 ± 634,5	3750 ± 362,6
5-HIAA	1311 ± 124,8	1386 ± 305	1337 ± 140	1108 ± 173
5HIAA/5-HT	0,28 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,34 ± 0,04	0,28 ± 0,03
NA	1704 ± 331,8	1962 ± 446,8	1922 ± 493,2	1528 ± 396,2
VMA	15,40 ± 3,60	32,55 ± 9,45	24,55 ± 7,35	25,97 ± 6,40
VMA/NA	0,022 ± 0,01	0,035 ± 0,01	0,011 ± 0,01	0,017 ± 0,002
GABA	13,00 ± 2,30	8,20 ± 1,10	20,43 ± 2,90	22,70 ± 3,50*
GLUTAMATO	77,16 ± 7,04	59,15 ± 8,02	99,35 ± 8,15	115,6 ± 7,55**

n = número de ratas por grupo.

ND = abaixo do limite de detecção <1,0ug

DA = dopamina, DOPAC = ácido 3,4, dihi/droxifenilacético, HVA = ácido homovanílico, 5-HT = serotonina, 5-HIAA = ácido 5-hidroxindolacético, NA = noradrenalina, VMA = ácido vanil-mandélico, GABA = ácido gama-aminobutírico.

ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: *p<0,05, **p<0,01 *versus* ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

Tabela 2.6. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no hipocampo de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

NT ou MB	Controle (n=09)	ISO50 (n=09)	ISO100 (n=09)	ISO200 (n=09)
DA	40,85 ± 9,50	27,85 ± 8,20	23,45 ± 4,95	42,55 ± 17,40
DOPAC	14,25 ± 2,45	9,50 ± 2,55	10,70 ± 3,05	12,00 ± 3,20
DOPAC/DA	0,30 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,60 ± 0,21	0,45 ± 0,08
HVA	ND	ND	ND	ND
5-HT	3546 ± 796	3423 ± 832	2539 ± 601	2466 ± 891
5-HIAA	2805 ± 529	24081 ± 524	2015 ± 486	1818 ± 448
5HIAA/5-HT	0,85 ± 0,04	0,65 ± 0,09	0,75 ± 0,04	0,82 ± 0,11
NA	451,2 ± 29,9	451,3 ± 20,40	458,2 ± 22,80	455,1 ± 6,03
VMA	317,4 ± 74,70	165,5 ± 38,70	188,8 ± 21,70	55,85 ± 2,50**
VMA/NA	0,41 ± 0,15	0,28 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,12 ± 0,004
GABA	31,50 ± 4,50	28,00 ± 2,60	28,40 ± 2,80	21,80 ± 2,40
GLUTAMATO	102 ± 9,04	106,5 ± 7,60	107,3 ± 8,30	91,44 ± 4,00

n = número de ratas por grupo

ND = abaixo do limite de detecção, <1,0ug

DA = dopamina, DOPAC = ácido 3,4, dihidroxifenilacético, HVA = ácido homovanílico, 5-HT = serotonina, 5-HIAA = ácido 5-hidroindolacético, NA = noradrenalina, VMA = ácido vanil-mandélico, GABA = ácido gama-aminobutírico

ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: $p > 0,05$ versus ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

Tabela 2.7. Níveis de neurotransmissores (NT) e seus metabólitos (MB), em ng/g de tecido, no estriado de ratas do grupo controle e de ratas tratadas com isoflavona, via gavagem, nas doses de 50 mg/kg (ISO50), 100 mg/kg (ISO100) e 200 mg/kg (ISO200) durante 90 dias. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão.

NT ou MB	Controle (n=10)	ISO50 (n=10)	ISO100 (n=10)	ISO200 (n=10)
DA	5785 ± 518	5214 ± 657	5836 ± 402	5357 ± 532
DOPAC	226 ± 10,70	314 ± 52,80	211,3 ± 12	219,6 ± 15
DOPAC/DA	0,041 ± 0,003	0,051 ± 0,01	0,03 ± 0,002	0,04 ± 0,002
HVA	161 ± 19,40	226,4 ± 52,40	166,4 ± 20,25	173 ± 17,25
HVA/DA	0,028 ± 0,003	0,033 ± 0,004	0,031 ± 0,005	0,032 ± 0,001
5-HT	1906 ± 231	2149 ± 270	1962 ± 191	2030 ± 255
5-HIAA	1638 ± 132	1731 ± 171	1486 ± 156	1684 ± 167
5HIAA/5-HT	0,90 ± 0,04	0,83 ± 0,03	0,81 ± 0,03	0,83 ± 0,03
NA	434,9 ± 96,35	584 ± 124,2	381,50 ± 90,40	356,70 ± 92,40
VMA	544 ± 72,4	224,7 ± 51,60	290 ± 38,40	256 ± 57,60
VMA/NA	1,70 ± 0,30	1,00 ± 0,25	1,30 ± 0,30	0,95 ± 0,15
GABA	27,70 ± 1,30	20,50 ± 2,20	20,40 ± 2,80	20,40 ± 2,10
GLUTAMATO	67,99 ± 3,90	58,20 ± 3,30	62,17 ± 6,40	60,55 ± 5,50

n = número de ratas por grupo

DA = dopamina, DOPAC = ácido 3,4, dihidroxifenilacético, HVA = ácido homovanílico, 5-HT = serotonina, 5-HIAA = ácido 5-hidroindolacético, NA = noradrenalina, VMA = ácido vanilmandélico, GABA = ácido gama-aminobutírico

ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's: $p > 0,05$ versus ratas do grupo controle.

Fonte: Sandini (2017).

DISCUSSÃO

2.6 DISCUSSÃO

Sabe-se que os estrógenos podem desempenhar importante função na regulação do peso corpóreo, consumo alimentar e deposição do tecido adiposo (KIM et al., 2006; DAVIS et al., 2015). Nesse sentido, nossos resultados mostraram que as ratas que receberam 50 mg/kg de ISOs apresentaram aumento no peso corpóreo a partir da 2ª semana de tratamento, bem como aumento no consumo de ração, enquanto as ratas que receberam 100 mg/kg mostraram diminuição do peso corpóreo a partir da 9ª semana de tratamento, sem diferença significativa no consumo de ração, evidenciando uma dose resposta não-monotônica. Com relação a esses parâmetros, peso corpóreo e ração, há estudos que mostraram que as ISOs ou seus compostos isoladamente (por exemplo, genisteína e daizeína) foram capazes de reduzir significativamente o peso corpóreo, bem como, em alguns casos, o consumo de ração em camundongos e ratos (LEPHART et al., 2004; KIM et al., 2006; KISHIDA et al., 2008). Enquanto, o tratamento com genisteína, durante 30 dias em camundongos, não alterou o peso corpóreo, porém houve aumento no consumo de ração (ZENG et al., 2010).

Considerando o uso de ISOs em mulheres na pós-menopausa, um estudo mostrou que a suplementação de isoflavona (<100 mg/kg) de soja durante 6 meses foi capaz de reduzir significativamente o peso corpóreo (ZHANG et al., 2013). Além disso, uma dieta a base de soja, durante 10 semanas, em mulheres na pós-menopausa, promoveu melhora do metabolismo, por meio da diminuição sérica de leptina e adiponectina, ambos hormônios relacionados com a obesidade (LLANOS et al., 2014). Sabe-se que os estrógenos podem influenciar a proliferação e diferenciação de adipócitos durante o desenvolvimento, e ambos $RE\beta$ e $RE\alpha$ são expressos em adipócitos e neurônios hipotalâmicos (PEDERSEN et al., 2001). De fato, essa redução do peso corpóreo tanto em roedores como no ser humano, pode estar associado a capacidade das ISOs, principalmente a genisteína em diminuir o número de adipócitos, aumentar a lipólise e induzir apoptose no tecido adiposo (SZKUDELSKA; NOGOWSKI;

SZKUDELSKI, 2000; 2008). Além disso, um estudo em ratas ovariectomizadas (OVX), que receberam uma dieta hipercalórica durante 4 semanas, mostrou que os animais tratados com ISOs, foram capazes de prevenir a obesidade estimulada pela dieta hipercalórica bem como pela cirurgia de castração, através da regulação da expressão do gene orexígeno periférico, por meio de regulação hipotalâmica (ZHANG et al., 2010). No presente estudo, podemos sugerir que a redução do peso corpóreo observada nas ratas que receberam ISO100 seja decorrente da ação direta da genisteína sobre o tecido adiposo e regulação hipotalâmica. Além disso, verificamos diminuição do consumo hídrico nas ratas tratadas com as diferentes doses de ISOs no decorrer do tratamento, o que pode ter sido decorrente do efeito hipotalâmico das ISOs. Contudo, Lephart et al., (2005), mostraram que o tratamento com ISOs em ratas jovens durante 6 semanas, foi capaz de aumentar o consumo de água. Nesse caso, sugerimos que essa diferença entre os resultados no consumo hídrico pode ser atribuída ao próprio metabolismo que difere com o passar da idade.

O CA é amplamente utilizado para avaliar o comportamento exploratório e a atividade geral em roedores (PRUT; BELZUNG, 2003; BELVIRANLI et al., 2012). Sabe-se que, em camundongos, os estrógenos podem modular a performance no CA e aumentar a atividade na *running wheel* (OGAWA et al., 2003). No que diz respeito ao tratamento com ISOs e atividade locomotora, um estudo mostrou que a daidzeína foi capaz de aumentar a exploração em camundongos no CA (ZENG et al., 2010), por outro lado, a administração perinatal de genisteína não causou alteração locomotora na prole de ratos (KOHARA et al., 2014). Nossos resultados não apontaram diferenças em nenhum dos parâmetros analisados no CA, corroborando achados de um estudo que mostrou que uma dieta a base de soja, durante 60 dias consecutivos em camundongos, jovens e de meia-idade, não foi capaz de alterar a atividade locomotora (BANSAL; PARLE, 2010a).

O labirinto em cruz elevado (LCE), bem como a caixa claro-escuro são testes utilizados para verificar efeitos ansiolíticos e/ou ansiogênicos. Sabe-se que, os hormônios ovarianos, como o estradiol e a progesterona, parecem modular o comportamento tipo ansiedade em ratos machos e fêmeas (WALF; FRYE, 2006; STARKEY; BRIDGES, 2010). Além disso, a ovariectomia *per se* aumenta a ansiedade em animais com diferentes idades, evidenciando que a

redução das concentrações dos hormônios esteroides ovarianos está diretamente relacionado com o aumento deste comportamento (DE CHAVES et al., 2009). Nesse sentido, ratas OVX tratadas com baixas doses de genisteína durante 4 dias, mostraram efeito ansiolítico na caixa claro-escuro, com maior frequência e tempo de exploração no compartimento claro (RODRÍGUEZ-LANDA et al., 2009). Ainda, um estudo realizado com ratos machos e fêmeas entre 10 e 11 meses de idade, que receberam ISOs ao longo da vida, ou seja, partir do 50º até o 300º dia de vida, mostrou redução da ansiedade no LCE em ambos grupos tratados (LUND; LEPHART, 2001). Contudo, nossos resultados não mostraram diferenças significantes no comportamento tipo-ansiedade em ratas de meia-idade que foram tratadas com diferentes doses de ISOs. Além disso, vale a pena comentar que, no presente estudo, não foram observadas diferenças nos níveis de 5-HT, do seu metabólito 5-HIAA bem como da taxa de renovação (5-HIAA/5-HT) em nenhuma das regiões encefálicas analisadas, que poderiam influenciar diretamente no comportamento tipo-ansioso. Sendo assim, fica evidente que o tratamento prolongado com diferentes doses de ISOs, não foi capaz modificar a ansiedade bem como, modular a transmissão serotoninérgica.

Em relação à análise das monoaminas, nossos resultados não mostraram diferenças significantes nos níveis de DA, NA e 5-HT, bem como nos respectivos metabólitos (DOPAC, HVA, VMA e 5-HIAA) analisados e na taxa de renovação. Contudo, recentemente, Saied e Hassan (2014), mostraram que 43 mg/kg de isoflavona durante 8 semanas, em ratos jovens foi capaz de aumentar os níveis de DA, NA e 5-HT no prosencéfalo. Ainda, um estudo conduzido em peixes machos *Betta splendens*, mostrou que a exposição a genisteína e equol, durante 28 dias, aumentou os níveis de DA no prosencéfalo (CLOTFELTER et al., 2010). Algumas hipóteses justificam o aumento dos níveis de DA após o tratamento com as ISOs, como: a diminuição da atividade da MAO (SAIED; HASSAN, 2014), melhora na síntese de DA ou diminuição da sua degradação, além de efeitos neuroprotetores em neurônios dopaminérgicos (KYUHO, 2008).

Com relação a concentração de 5-HT, ratos tratados com genisteína não mostraram diferenças no conteúdo desta monoamina no núcleo ventromedial do hipotálamo (PATISAUL; FORTINO; POLSTON, 2008), corroborando nossos achados. Clotfelter et al., (2010) também não encontraram diferenças na

concentração de 5-HT no prosencéfalo de peixes que foram expostos a genisteína, enquanto a exposição ao equol, mostrou diminuição desta monoamina. Por outro lado, Saied e Hassam (2014), observaram que a exposição a ISOs durante 8 semanas, aumentou os níveis de 5-HT, diminuiu os níveis de 5-HIAA, bem como diminuiu a taxa de renovação no prosencéfalo de ratos machos, evidenciando alteração no metabolismo da 5-HT. Nesse caso, as diferenças encontradas entre os resultados acima podem ser atribuídas ao tempo de tratamento, dose, espécie e gênero animal.

Dentre os efeitos decorrentes da queda dos níveis de estradiol na menopausa, tem-se destacado o prejuízo cognitivo, uma vez que este hormônio parece modular a memória, bem como outras funções cognitivas em animais e em seres humanos (HENDERSON, 2008; WATSON et al., 2010). Os efeitos cognitivos provenientes do estradiol são mediados por meio de sistemas neurais no córtex, prosencéfalo basal, hipocampo e estriado através dos receptores de estrógenos α e β (LUINE, 2014). No que diz respeito aos fitoestrógenos, alguns estudos apontam melhora da resposta cognitiva em modelos animais (SARKAKI A et al., 2009; ALONSO et al., 2010; BAGHERI et al., 2011; SAFAHANI et al., 2011) e em mulheres na menopausa (DUFFY; WISEMAN; FILE, 2003; KREIJKAMP-KASPERS et al., 2007; CHEN; LIN; LIU, 2015). Contudo, os mecanismos neurais envolvidos na melhora da resposta cognitiva, ainda são pouco conhecidos e explorados. Nesse sentido, avaliamos a esfera comportamental cognitiva por meio da memória espacial no LB e alterações nos níveis de neurotransmissores.

Nossos resultados no LB mostraram que as ratas que receberam diferentes doses de ISOs durante 90 dias, apresentaram menor latência para encontrar a CE, indicando melhora na aquisição da informação desde o primeiro dia de treino até o dia do teste. Vale a pena lembrar que, nossos resultados não apontaram nenhum comportamento tipo-ansioso e nem prejuízo locomotor, o que pode interferir diretamente na performance no LB (ROSENFELD; FERGUSON, 2014), uma vez que o aumento da ansiedade pode prejudicar a aquisição da memória em roedores (DARCET et al., 2014), bem como no ser humano (ROBINSON et al., 2013; ARBABI et al., 2015). Além disso, a navegação espacial é um elemento importante para o LB, e sabe-se que mudanças fisiológicas no hipocampo, córtex entorrinal ou em outras áreas

corticais, podem afetar diretamente o desempenho nesse teste (WOLBERS; HEGARTY, 2010; FOSTER; KNIERIM, 2012). Nesse sentido, um estudo mostrou que a suplementação com ISO promoveu melhora da memória visuoespacial em ratos machos e fêmeas OVX no labirinto aquático de Morris, e esse efeito foi associado com o aumento da esteroidogênese no hipocampo (FRIEDMAN; FRYE, 2011). Um estudo *in vitro*, mostrou que a genisteína e daidzeína foram capazes de melhorar a viabilidade e a proliferação de células neuronais hipocampais, provavelmente por meio de efeitos neuroprotetores mediados pelo aumento da expressão de BDNF (PAN et al., 2012), evidenciando a ação das ISOs nessa região. Contudo, nossos resultados, não mostraram diferenças nos níveis de neurotransmissores no hipocampo, porém, vale ressaltar que o CPF parece ser um dos maiores locais de ligação aos estrógenos (KEENAN et al., 2011; SHANMUGAN; EPPERSON, 2014), além de estar envolvido com o processamento de memórias (PRESTON; EICHENBAUM, 2013). Adicionalmente, estudos conduzidos em ratos jovens e idosos, mostraram que a estimulação intracranial no hipotálamo lateral, foi capaz de promover melhora na flexibilidade cognitiva, bem como na consolidação da memória, em testes de alternância cognitiva e labirinto aquático de Morris (SORIANO-MAS et al., 2005; RUIZ-MEDINA et al., 2008). Além disso, a estimulação bilateral do hipotálamo promoveu a evocação de memórias autobiográficas detalhadas em seres humanos (HAMANI et al., 2008). Dessa forma, no presente estudo, é plausível sugerir que a melhora na latência para encontrar a CE no LB, seja decorrente das alterações nos níveis de neurotransmissores, especificamente do glutamato e do GABA, observado no CPF e no hipotálamo.

O glutamato é o mais importante neurotransmissor excitatório do SNC e o principal neurotransmissor de sistemas eferentes corticais (FONNUM, 1984). Este neurotransmissor está diretamente envolvido no processo de aprendizado e memória (MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000), além de desempenhar importante papel no surgimento de desordens psiquiátricas (MERRITT; MCGUIRE; EGERTON, 2013) e doenças neurodegenerativas (ANTUONO et al., 2001; SHELDON; ROBINSON, 2007; LAU; TYMIANSKI, 2010). Estudos em roedores, bem como em seres humano, tem demonstrado uma relação entre a diminuição deste aminoácido com o aumento da idade, em diferentes regiões, incluindo áreas motoras, sensoriais e hipocampo (BANAY-SCHWARTZ; LAJTHA;

PALKOVITS, 1989; KAISER et al., 2005; RAININKO; MATTSSON, 2010). Mais especificamente, um estudo de metanálise, que comparou indivíduos jovens (18 anos de idade) e adultos (31 anos de idade), mostrou diminuição progressiva nas concentrações de glutamato com o aumento da idade, na substância cinzenta, principalmente na região do córtex frontal (MARSMAN; MANDL; et al., 2013). Ainda, outro estudo conduzido em pacientes com esquizofrenia, mostrou progressiva diminuição nas concentrações de glutamato com o aumento da idade em regiões frontais, sugerindo que baixos níveis de glutamato intra ou extracelular também podem estar associados com o surgimento de doenças neuropsiquiátricas (MARSMAN; VAN DEN HEUVEL; et al., 2013). Nossos resultados mostraram aumento nos níveis de glutamato no CPF de ratas que receberam ISO100 e ISO200 e, no hipotálamo de ratas que receberam ISO200. Nesse sentido, atribuímos que o tratamento prolongado à ISOs em ratas de meia-idade foi capaz de prevenir a diminuição dos níveis de glutamato que ocorre no envelhecimento natural.

Com relação ao uso de fitoestrógenos, a literatura carece de estudos que mostrem efeitos *in vivo*, da associação destes compostos com o sistema glutamatérgico. Contudo, estudos *in vitro*, demonstraram que as ISOs foram capazes de promover efeito citoprotetor em culturas neuronais expostas à toxicidade do glutamato (ZHAO; CHEN; BRINTON, 2002; OCCHIUTO et al., 2008), indicando efeito neuroprotetor destes compostos. Nesse sentido, atribuímos que o tratamento prolongado à ISOs em ratas de meia-idade, além de prevenir a diminuição dos níveis de glutamato que ocorre no envelhecimento natural, também pode estar diretamente associado com a melhora da performance cognitiva observada no LB, por meio da ativação de receptores di tipo NMDA e consequente indução da potenciação de longa duração.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos, cerca de 25-50% das sinapses, são de natureza GABAérgica. A homeostase entre a neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica é importante para manter a excitabilidade neuronal, prevenido a hiperexcitabilidade que pode desencadear doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (LYDIARD, 2003). Nesse sentido, podemos sugerir que o tratamento prolongado com ISOs foi capaz de manter a homeostasia entre os sistemas excitatório e inibitório, uma vez que houve aumento em ambos neurotransmissores no CPF e no hipotálamo.

Além disso, o aumento da idade está relacionado com desregulação na sinalização GABAérgica no CPF, o que pode contribuir em prejuízos observados na memória de trabalho (MCQUAIL; FRAZIER; BIZON, 2015), demonstrando o envolvimento do GABA em processos de aprendizado e memória. Desse modo, além do efeito neuroprotetor, podemos ainda atribuir que tratamento prolongado as ISOs, foi capaz de melhorar a performance espacial no LB através da neurotransmissão GABAérgica, bem como da glutamatérgica. Além disso, um estudo *in vitro* mostrou que diferentes doses de ISOs foram capazes de se ligar aos receptores GABA_A (GAVANDE et al., 2011), evidenciando um possível potencial terapêutico para o tratamento de desordens relacionadas ao SNC, corroborando nossa hipótese sobre o efeito neuroprotetor.

O declínio dos níveis de estrógeno está associado a diversas mudanças metabólicas tais como, resistência à insulina, maior predisposição de desenvolver diabetes mellitus do tipo 2 e dislipidemia (BARTON, 2013). Essa alteração no perfil lipídico é caracterizada por níveis elevados de triglicerídeos, níveis baixos da lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumento dos níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Barton, 2013, Davis et al., 2015). No que diz respeito ao uso das ISOs e melhora do perfil lipídico, diferentes estudos têm apontado diminuição dos níveis de triglicerídeos, LDL e aumento nos níveis de HDL em mulheres na pós-menopausa e em mulheres que possuem a síndrome do ovário policístico (ZHAN; HO, 2005; KHANI et al., 2011; CICERO et al., 2013). Por outro lado, um estudo conduzido com mulheres entre 45 e 60 anos de idade, mostrou que o uso de 84 e 126 mg de gérmen de soja, não promoveu efeito no perfil lipídico sanguíneo (YE et al., 2012). Estudos experimentais têm demonstrado que o consumo de soja promoveu melhora no perfil lipídico sanguíneo, redução de lipídios hepáticos, supressão da expressão de genes para enzimas lipogênicas, além de regular a expressão dos genes para a degradação lipídica em ratos machos (TORRE-VILLALVAZO et al., 2008; KITAWAKI et al., 2009; FRIGOLET et al., 2011; KOBAYASHI; EGUSA; FUKUDA, 2014). Contudo, nossos resultados não mostraram diferenças em nenhum dos parâmetros lipídicos avaliados, bem como nos níveis de glicose, corroborando achados que não encontraram diferenças no perfil lipídico em ratos machos que foram tratados durante 8 semanas com proteína de soja (GHANEM, 2007). Essa discrepância do efeito benéfico das ISOs sobre o metabolismo lipídico nos

estudos acima, bem como a falta de conclusões está relacionada a vários fatores como: a variabilidade dos desenhos experimentais e protocolos de exposição (via de administração, composição, dose e duração), a capacidade dos indivíduos para produzir equol e a susceptibilidade genética (CEDERROTH et al., 2007).

Sabe-se que as ISOs tem sido utilizada como uma terapia natural para a reposição hormonal, devido à capacidade de se ligar aos receptores de estrógeno e desencadear respostas estrogênicas (BELCHER; ZSARNOVSZKY, 2001). Na análise de estradiol, nossos resultados mostraram aumento nos níveis de estradiol em ratas que receberam ISO100 e ISO200, dessa forma, é possível inferir que houve ativação dos REs. Vale a pena lembrar que os RE α são expressos abundantemente no hipotálamo, enquanto os RE β são expressos no hipocampo, córtex e cerebelo (MITRA et al., 2003). Sendo assim, é possível especular que houve ativação de ambos receptores, principalmente no hipotálamo e córtex e que está ativação pode estar diretamente relacionada com a melhora da performance espacial no LB, uma vez que a diminuição de estrógenos está associada a déficits cognitivos, bem como com o surgimento da Doença de Alzheimer em mulheres na menopausa (JANICKI; SCHUPF, 2010).

Recentemente, o uso das ISOs tem ganhado destaque devido ao efeito radioprotetor em modelo animal, contra radiação usada para tratar câncer de pulmão (HILLMAN; SINGH-GUPTA; HOOGSTRA; et al., 2013; HILLMAN; SINGH-GUPTA; LONARDO; et al., 2013; ABERNATHY et al., 2015). As ISOs foram capazes de inibir a infiltração e ativação de macrófagos e neutrófilos induzidos pela radiação nos pulmões, dessa forma, evidenciando um efeito protetor contra o processo inflamatório induzido pela radiação (Abernathy, et al. 2015). Além disso, os pulmões de camundongos que foram tratados com ISOs antes e depois da radiação, mostraram que os bronquíolos estavam normais, que os alvéolos e os vasos sanguíneos estavam com infiltrado inflamatório mínimo em comparação aos pulmões dos animais tratados somente com radiação (Hillman, et al., 2013b). Dessa forma, é possível sugerir que a diminuição do peso relativo dos pulmões das ratas que receberam ISO100 e ISO200, seja decorrente do efeito direto das ISOs nesse órgão, por meio da inibição de neutrófilos e macrófagos alveolares, uma vez que foi verificado edema nos pulmões em uma rata do grupo controle. Contudo, estudos futuros

em animais senescentes são necessários para compreender melhor o possível efeito protetor das ISOs nos pulmões.

Em suma, nossos resultados mostraram que o tratamento prolongado com diferentes doses de ISOs em ratas de meia-idade, não modificou a atividade motora e nem o comportamento tipo-ansioso, porém foi capaz de melhorar a performance espacial no LB nas três doses estudadas, possivelmente devido ao aumento dos níveis de glutamato e de GABA no CPF e no hipotálamo, evidenciando também um efeito neuroprotetor, além da ativação de receptores de estrógenos em ambas regiões encefálicas.

CONCLUSÕES

2.7 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que o tratamento prolongado com diferentes doses ISOs (50, 100 e 200 mg/kg) durante 90 dias em ratas de meia-idade:

- Não evidenciou sinais clínicos de toxicidade, modificou o peso corpóreo, consumo de ração e de água;
- Não alterou a atividade motora avaliada no campo aberto;
- Não modificou o comportamento tipo-ansioso avaliado no labirinto em cruz elevado, bem como na caixa claro-escuro;
- Promoveu melhora na performance espacial avaliada no labirinto Barnes;
- Não modificou os parâmetros bioquímicos séricos, porém promoveu aumento dos níveis de estradiol;
- Promoveu aumento dos níveis de aminoácidos, GABA e glutamato no córtex pré-frontal e hipotálamo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Cur Opin Neurobiol** v. 11, n. 2, p. 180-187, 2001.

ABERNATHY, L. M. et al. Soy Isoflavones Promote Radioprotection of Normal Lung Tissue by Inhibition of Radiation-Induced Activation of Macrophages and Neutrophils. **Journal of Thoracic Oncology** v. 10, n. 12, p. 1703-1712, 2015.

AGGLETON, J. P. et al. Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. **Behavioral Neuroscience** v. 124, n. 1, p. 55-68, 2010.

AHMAD, A. et al. Total isoflavones from soybean and tempeh reversed scopolamine-induced amnesia, improved cholinergic activities and reduced neuroinflammation in brain. **Food Chem Toxicol** v. 65, p. 120-128, 2014.

AÏD, S. et al. Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. **Journal of Lipid Research** v. 44, n. 8, p. 1545-1551, 2003.

AKBAR, M. et al. Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 102, n. 31, p. 10858-10863, 2005.

AKILA, V. P. et al. Age related changes in lipid peroxidation and antioxidants in elderly people. **Indian Journal of Clinical Biochemistry** v. 22, n. 1, p. 131-134, 2007.

AL-SAFI, Z. A.; SANTORO, N. Menopausal hormone therapy and menopausal symptoms. **Fertility and Sterility** v. 101, n. 4, p. 905-915, 2014.

ALBERINI, C. M.; MILEKIC, M. H.; TRONEL, S. Memory. **Cellular and Molecular Life Sciences** v. 63, n. 9, p. 999-1008, 2006.

ALMSTRUP, K. et al. Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves. **Environmental Health Perspectives** v. 110, n. 8, p. 743-748, 2002.

ALONSO, A. et al. Acute effects of 17 β -estradiol and genistein on insulin sensitivity and spatial memory in aged ovariectomized female rats. **Age** v. 32, n. 4, p. 421-434, 2010.

ALVES, V. P.; VIANNA, L. G. Políticas públicas para a educação gerontológica na perspectiva da inserção social do idoso: desafios e possibilidades. **Ensaio: Avaliação e Políticas Públicas em Educação** v. 18, p. 489-510, 2010.

AMANO, A. et al. Age-related changes of dopamine, noradrenaline and adrenaline in adrenal glands of mice. **Geriatrics & Gerontology International** v. 13, n. 2, p. 490-496, 2013.

ANDRÉ, A. et al. Plasmalogen metabolism-related enzymes in rat brain during aging: influence of n-3 fatty acid intake. **Biochimie** v. 88, n. 1, p. 103-111, 2006.

ANGELOVA, P. R.; MÜLLER, W. S. Arachidonic acid potently inhibits both postsynaptic-type Kv4.2 and presynaptic-type Kv1.4 IA potassium channels. **European Journal of Neuroscience** v. 29, n. 10, p. 1943-1950, 2009.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing** v. 13, n. 2, p. 93-110, 2012.

ANTUONO, P. G. et al. Decreased glutamate + glutamine in Alzheimer's disease detected in vivo with (1)H-MRS at 0.5 T. **Neurology** v. 56, n. 6, p. 737-742, 2001.

APPOLINÁRIO, P. P. et al. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurodegenerativas. **Química Nova** v. 34, p. 1409-1416, 2011.

ARAFA, N. M. S.; ALI, E. H. A. Protective Role of Either Ginger or Lipoic Acid in Senile Female Rats. **Research in Neuroscience** v. 3, p. 22-28, 2014.

ARBABI, M. et al. Correlates of memory complaints and personality, depression, and anxiety in a memory clinic. **Acta Medica Iranica**, p. 6, 2015.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour** v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ASHABI, G. et al. The effects of hippocampal opioidergic and septal GABAergic system interactions on anxiety-like behavior in rats. **Life Sciences** v. 89, n. 21-22, p. 821-826, 2011.

ATMACA, A. et al. Soy isoflavones in the management of postmenopausal osteoporosis. **Menopause** v. 15, n. 4, p. 748-757, 2008.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. **Pharmacological Reviews** v. 64, n. 2, p. 238-258, 2012.

BÄCKMAN, L. et al. Linking cognitive aging to alterations in dopamine neurotransmitter functioning: Recent data and future avenues. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 34, n. 5, p. 670-677, 2010.

BÄCKMAN, L. et al. The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: Current status and future prospects. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 30, n. 6, p. 791-807, 2006.

BAGHERI, M. et al. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid β (1–40) rat model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Learning and Memory** v. 95, n. 3, p. 270-276, 2011.

BAI, Z.; GUST, R. Breast Cancer, Estrogen Receptor and Ligands. **Archiv der Pharmazie** v. 342, n. 3, p. 133-149, 2009.

BANAY-SCHWARTZ, M.; LAJTHA, A.; PALKOVITS, M. Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements I. Glutamate and related amino acids. **Neurochem Res** v. 14, n. 6, p. 555-562, 1989.

BANSAL, N.; PARLE, M. Effect of soybean supplementation on the memory of alprazolam-induced amnesic mice. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences** v. 2, n. 2, p. 144-147, 2010a.

_____. Soybean Supplementation Helps Reverse Age- and Scopolamine-Induced Memory Deficits in Mice. **Journal of Medicinal Food** v. 13, n. 6, p. 1293-1300, 2010b.

BARNES, C. A. et al. Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. **Neuroscience** v. 99, n. 1, p. 17-23, 2000.

BARNES, L. L. et al. Social resources and cognitive decline in a population of older African Americans and whites. **Neurology** v. 63, n. 12, p. 2322-2326, 2004.

BARROS, H. M. et al. The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. **Pharmacology & Toxicology** v. 74, p. 339-344, 1994.

BARTON, M. Cholesterol and atherosclerosis: modulation by oestrogen. **Current Opinion in Lipidology** v. 24, n. 3, p. 214-220, 2013.

BATISTONI, S. S. T.; NAMBA, C. S. Idade subjetiva e suas relações com o envelhecimento bem-sucedido. **Psicologia em Estudo** v. 15, p. 733-742, 2010.

BAZAN, N. G. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care** v. 10, n. 2, p. 136-141, 2007.

BAZAN, N. G.; MOLINA, M. F.; GORDON, W. C. Docosahexaenoic Acid Signalolipidomics in Nutrition: Significance in Aging, Neuroinflammation, Macular Degeneration, Alzheimer's, and Other Neurodegenerative Diseases. **Annual Review of Nutrition** v. 31, n. 1, p. 321-351, 2011.

BEAULIEU, J.-M.; ESPINOZA, S.; GAINETDINOV, R. R. Dopamine receptors – IUPHAR Review 13. **British Journal of Pharmacology** v. 172, n. 1, p. 1-23, 2015.

BECK, V. B.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v. 94, n. 5, p. 499-518, 2005.

BELCHER, S. M.; ZSARNOVSZKY, A. Estrogenic Actions in the Brain: Estrogen, Phytoestrogens, and Rapid Intracellular Signaling Mechanisms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 299, n. 2, p. 408-414, 2001.

BELL, C.; ABRAMS, J.; NUTT, D. Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. **The British Journal of Psychiatry** v. 178, n. 5, p. 399-405, 2001.

BELLOU, S. et al. The isoflavone metabolite 6-methoxyequol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. **Molecular Cancer** v. 11, n. 1, p. 35, 2012.

BELVIRANLI, M. et al. Age, Sex and Anxiety Affect Locomotor Activity in Rats. **Proceedings of Measuring Behavior** p. 28-31, 2012.

BENGOETXEA, X.; RODRIGUEZ-PERDIGON, M.; RAMIREZ, M. J. Object recognition test for studying cognitive impairments in animal models of Alzheimer's disease. **Frontiers in Bioscience** v. 7, p. 10-29, 2015.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of apomorphine administration on rearing activity of control and experimental rats withdrawn from long-term haloperidol treatment. **General pharmacology** v. 15, n. 4, p. 363-365, 1984.

BERTOLINI, A.; POGGIOLI, R.; VERGONI, A. V. Cross-Species Comparison of the ACTH-induced Behavioral Syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 525, n. 1, p. 114-129, 1988.

BERTRAND, P. P.; BERTRAND, R. L. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical** v. 153, n. 1, p. 47-57, 2010.

BETHUS, I.; TSE, D.; MORRIS, R. G. M. Dopamine and Memory: Modulation of the Persistence of Memory for Novel Hippocampal NMDA Receptor-Dependent Paired Associates. **The Journal of Neuroscience** v. 30, n. 5, p. 1610-1618, 2010.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nature Protocols** v. 1, n. 3, p. 1306-1311, 2006.

BEYDOUN, M. A. et al. Plasma n-3 fatty acids and the risk of cognitive decline in older adults: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 85, n. 4, p. 1103-1111, 2007.

BHATHENA, S. J.; VELASQUEZ, M. T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 76, n. 6, p. 1191-1201, 2002.

BISHOP, N. A.; LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature** v. 464, n. 7288, p. 529-535, 2010.

BLAKE, C. et al. Neuromodulation by soy diets or equol: Anti-depressive & anti-obesity-like influences, age- & hormone-dependent effects. **BMC Neuroscience** v. 12, n. 1, p. 28, 2011.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 25, n. 3, p. 205-218, 2001.

BOGUSZEWSKI, P.; ZAGRODZKA, J. Emotional changes related to age in rats - a behavioral analysis. **Behavioural Brain Research** v. 133, n. 2, p. 323-332, 2002.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology** v. 463, n. 1-3, p. 55-65, 2003.

BROADBENT, N. J. et al. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learning & Memory** v. 17, n. 1, p. 5-11, 2010.

BROOKS, J. D.; THOMPSON, L. U. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v. 94, n. 5, p. 461-467, 2005.

BROWN, M. W.; AGGLETON, J. P. Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? **Nature Reviews. Neuroscience** v. 2, n. 1, p. 51-61, 2001.

BRYANT, C.; JACKSON, H.; AMES, D. The prevalence of anxiety in older adults: Methodological issues and a review of the literature. **Journal of Affective Disorders** v. 109, n. 3, p. 233-250, 2008.

BUHOT, M.-C.; MARTIN, S.; SEGU, L. Role of serotonin in memory impairment. **Annals of Medicine** v. 32, n. 3, p. 210-221, 2000.

CALDER, P. C. Dietary arachidonic acid: harmful, harmless or helpful? **British Journal of Nutrition** v. 98, n. 3, p. 451-453, 2007.

CANO, A.; GARCÍA-PÉREZ, M. Á.; TARÍN, J. J. Isoflavones and cardiovascular disease. **Maturitas** v. 67, n. 3, p. 219-226, 2010.

CANTERAS, N. S. et al. Neuroanatomy of Anxiety. In: STEIN, B. M. e STECKLER, T. (Ed.). **Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p.77-96.

CAPDEVILA, J. H.; FALCK, J. R.; HARRIS, R. C. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. **Journal of Lipid Research** v. 41, n. 2, p. 163-181, 2000.

CARDOSO, J. R.; BÃO, S. N. Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. **Animal Reproduction Science** v. 97, n. 3, p. 237-245, 2007.

CARMEN, V.; EVA, M. G.; MONICA DE LA, F. Increase of Oxidation and Inflammation in Nervous and Immune Systems with Aging and Anxiety. **Current Pharmaceutical Design** v. 20, n. 29, p. 4656-4678, 2014.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. et al. Environmental and genetic variation of isoflavone content of soybean seeds grown in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 44, p. 1444-1451, 2009.

CARVALHO, J. A. M.; GARCIA, R. A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Cadernos de Saúde Pública** v. 19, p. 725-733, 2003.

CARVER, J. D. et al. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. **Brain Research Bulletin** v. 56, n. 2, p. 79-85, 2001.

CASSIDY, A. et al. Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. **Proceedings of the Nutrition Society** v. 65, n. 1, p. 76-92, 2006.

CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 80, n. 7, p. 1044-1062, 2000.

CEDERROTH, C. R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 304, n. 1–2, p. 30-42, 2009.

CEDERROTH, C. R. et al. A Phytoestrogen-Rich Diet Increases Energy Expenditure and Decreases Adiposity in Mice. **Environmental Health Perspectives** v. 115, n. 10, p. 1467-1473, 2007.

CHALON, S. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** v. 75, n. 4, p. 259-269, 2006.

CHAN, K. F. Y. et al. GABAB receptor antagonism abolishes the learning impairments in rats with chronic atypical absence seizures. **European Journal of Pharmacology** v. 541, n. 1–2, p. 64-72, 2006.

CHANDRASEKHARAN, S.; AGLIN, A. Pharmacokinetics of Dietary Isoflavones. **Journal Steroids and Hormonal Science** v. 12, p. 1-8, 2013.

CHEN, M. N.; LIN, C. C.; LIU, C. F. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. **Climacteric** v. 18, n. 2, p. 260-269, 2015.

CHENG, G. et al. Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. **Menopause** v. 14, n. 3, p. 468-473, 2007.

CHENG, Z.; LI, Y. What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. **Chemical Reviews** v. 107, n. 3, p. 748-766, 2007.

CHOI, E. J.; KIM, G.-H. Daidzein causes cell cycle arrest at the G1 and G2/M phases in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-453 cells. **Phytomedicine** v. 15, n. 9, p. 683-690, 2008.

CHOI, S. Y. et al. Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure-activity relationships. **Planta Medica** v. 74, n. 1, p. 25-32, 2008.

CICERO, A. F. G. et al. Combined Nutraceutical Approach to Postmenopausal Syndrome and Vascular Remodeling Biomarkers. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine** v. 19, n. 6, p. 582-587, 2013.

CIRCOSTA, C. et al. Effects of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*) on skin changes induced by ovariectomy in rats. **Phytotherapy Research** v. 20, n. 12, p. 1096-1099, 2006.

CLARK, R. E.; ZOLA, S. M.; SQUIRE, L. R. Impaired Recognition Memory in Rats after Damage to the Hippocampus. **The Journal of Neuroscience** v. 20, n. 23, p. 8853-8860, 2000.

CLARKE, J. R. et al. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 107, n. 6, p. 2652-2657, 2010.

CLOTFELTER, E. D. et al. Modulation of monoamine neurotransmitters in fighting fish *Betta splendens* exposed to waterborne phytoestrogens. **Fish Physiol Biochem** v. 36, n. 4, p. 933-943, 2010.

COHEN, SARAH J. et al. The Rodent Hippocampus Is Essential for Nonspatial Object Memory. **Current Biology** v. 23, n. 17, p. 1685-1690, 2013.

COLLIER, T. J. et al. Reduced cortical noradrenergic neurotransmission is associated with increased neophobia and impaired spatial memory in aged rats. **Neurobiology of Aging** v. 25, n. 2, p. 209-221, 2004.

COOKE, P. S.; NAAZ, A. Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. **Experimental Biology and Medicine** v. 229, n. 11, p. 1127-1135, 2004.

COUSE, J. F. et al. Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α (ER α) and Estrogen Receptor- β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER α -Knockout Mouse. **Endocrinology** v. 138, n. 11, p. 4613-4621, 1997.

COWAN, N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? **Progress in brain research** v. 169, p. 323-338, 2008.

CRAWLEY, J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 15, p. 695-699, 1981.

CRISAFULLI, A. et al. Effects of genistein on hot flushes in early postmenopausal women: a randomized, double-blind EPT- and placebo-controlled study. **Menopause** v. 11, n. 4, p. 400-404, 2004.

DARCET, F. et al. Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. **Frontiers in Behavioral Neuroscience** v. 8, p. 136, 2014.

DAS, U. N. et al. Polyunsaturated fatty acids augment free radical generation in tumor cells in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 145, n. 1, p. 15-24, 1987.

DAVIS, S. R. et al. Menopause. **Nature Reviews Disease Primers** v. 1, p. 15004, 2015.

DAWSON, G. R.; TRICKLEBANK, M. D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 16, n. 2, p. 33-36, 1995.

DAY, A. J. et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **FEBS Letters** v. 468, n. 2-3, p. 166-170, 2000.

DE CHAVES, G. et al. Effects of long-term ovariectomy on anxiety and behavioral despair in rats. **Physiol Behav** v. 97, n. 3-4, p. 420-425, 2009.

DE KONING-VEREST, I. F. Glutamate metabolism in ageing rat brain. **Mechanisms of Ageing and Development** v. 13, n. 1, p. 83-92, 1980.

DE LA MORA, M. P. et al. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. **Progress in Neurobiology** v. 90, n. 2, p. 198-216, 2010.

DENIS, I. et al. Omega-3 fatty acids and brain resistance to ageing and stress: Body of evidence and possible mechanisms. **Ageing Research Reviews** v. 12, n. 2, p. 579-594, 2013.

DERE, E.; HUSTON, J. P.; DE SOUZA SILVA, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 31, n. 5, p. 673-704, 2007.

DERE, E. et al. The case for episodic memory in animals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 30, n. 8, p. 1206-1224, 2006.

DEROGIS, P. B. M. C. et al. The Development of a Specific and Sensitive LC-MS-Based Method for the Detection and Quantification of Hydroperoxy- and Hydroxydocosahexaenoic Acids as a Tool for Lipidomic Analysis. **PLoS ONE** v. 8, n. 10, p. e77561, 2013.

DIAZ, M. R. et al. Dopamine D3-Like Receptors Modulate Anxiety-Like Behavior and Regulate GABAergic Transmission in the Rat Lateral/Basolateral Amygdala. **Neuropsychopharmacology** v. 36, n. 5, p. 1090-1103, 2011.

DING, B. J. et al. Soybean isoflavone alleviates β -amyloid 1-42 induced inflammatory response to improve learning and memory ability by down regulation of Toll-like receptor 4 expression and nuclear factor- κ B activity in rats. **Int J Dev Neurosci** v. 29, n. 5, p. 537-542, 2011.

DING, J. et al. Soybean isoflavone ameliorates β -amyloid 1-42-induced learning and memory deficit in rats by protecting synaptic structure and function. **Synapse** v. 67, n. 12, p. 856-864, 2013.

DIX, S. L.; AGGLETON, J. P. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. **Behavioural Brain Research** v. 99, n. 2, p. 191-200, 1999.

DIXON, R. A. Phytoestrogens. **Annual Review of Plant Biology** v. 55, n. 1, p. 225-261, 2004.

DOERGE, D. R. Bioavailability of soy isoflavones through placental/lactational transfer and soy food. **Toxicology and Applied Pharmacology** v. 254, n. 2, p. 145-147, 2011.

DOYLE, M.; KIEBLER, M. A. Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. **The EMBO Journal** v. 30, n. 17, p. 3540-3552, 2011.

DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? **Annual Review of Psychology** v. 55, n. 1, p. 51-86, 2004.

DUFFY, R.; WISEMAN, H.; FILE, S. E. Improved cognitive function in postmenopausal women after 12 weeks of consumption of a soya extract containing isoflavones. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 75, n. 3, p. 721-729, 2003.

ELDRIDGE, A. C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 30, n. 2, p. 353-355, 1982.

ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J. A. Oestrogen receptors - an overview. **J Intern Med** v. 246, n. 2, p. 133-8, 1999.

ENNACEUR, A. et al. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. **Behavioural Brain Research** v. 159, n. 2, p. 247-266, 2005.

FARAJI, J.; METZ, G. A.; SUTHERLAND, R. J. Characterization of spatial performance in male and female Long-Evans rats by means of the Morris water task and the zigurat task. **Brain Research Bulletin** v. 81, n. 1, p. 164-172, 2010.

FELICIO, L. F. et al. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Res Bull** v. 40, n. 4, p. 253-256, 1996.

FISCHER, W. et al. Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. **Neurobiology of Aging** v. 13, n. 1, p. 9-23, 1992.

FOGAÇA, M. V. et al. The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. **Neuropharmacology** v. 63, n. 2, p. 202-210, 2012.

FONNUM, F. Glutamate: A Neurotransmitter in Mammalian Brain. **Journal of Neurochemistry** v. 42, n. 1, p. 1-11, 1984.

FOSTER, A. C.; KEMP, J. A. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. **Current Opinion in Pharmacology** v. 6, n. 1, p. 7-17, 2006.

FOSTER, D. J.; KNIERIM, J. J. Sequence learning and the role of the hippocampus in rodent navigation. **Curr Opin Neurobiol** v. 22, n. 2, p. 294-300, 2012.

FRANCIS, B. M. et al. Reduced Tissue Levels of Noradrenaline Are Associated with Behavioral Phenotypes of the TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Neuropsychopharmacology** v. 37, n. 8, p. 1934-1944, 2012.

FRASER, T.; TAYLER, H.; LOVE, S. Fatty Acid Composition of Frontal, Temporal and Parietal Neocortex in the Normal Human Brain and in Alzheimer's Disease. **Neurochemical Research** v. 35, n. 3, p. 503-513, 2010.

FRICK, K. M. Estrogens and age-related memory decline in rodents: What have we learned and where do we go from here? **Hormones and Behavior** v. 55, n. 1, p. 2-23, 2009.

FRIEDMAN, J.; FRYE, C. Anti-anxiety, cognitive, and steroid biosynthetic effects of an isoflavone-based dietary supplement are gonad and sex-dependent in rats. **Brain Res** v. 1379, p. 164-175, 2011.

FRIGOLET, M. E. et al. White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte metabolic functions after soy protein consumption in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry** v. 22, n. 2, p. 118-129, 2011.

FROESTL, W. et al. Phosphinic Acid Analogs of GABA. 2. Selective, Orally Active GABAB Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry** v. 38, n. 17, p. 3313-3331, 1995.

FURINI, C. R. G. et al. D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. **Behavioural Brain Research** v. 271, p. 212-217, 2014.

GALLAGHER, D. et al. Anxiety and behavioural disturbance as markers of prodromal Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. **International Journal of Geriatric Psychiatry** v. 26, n. 2, p. 166-172, 2011.

GAMOH, S. et al. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. **Neuroscience** v. 93, n. 1, p. 237-241, 1999.

GARTOULLA, P. et al. Prevalence of menopausal symptoms in Australian women at midlife: a systematic review. **Climacteric** v. 17, n. 5, p. 529-539, 2014.

GAVANDE, N. et al. Identification of Benzopyran-4-one Derivatives (Isoflavones) as Positive Modulators of GABAA Receptors. **ChemMedChem** v. 6, n. 8, p. 1340-1346, 2011.

GE, Y. et al. Age-Related Total Gray Matter and White Matter Changes in Normal Adult Brain. Part I: Volumetric MR Imaging Analysis. **American Journal of Neuroradiology** v. 23, n. 8, p. 1327-1333, 2002.

GELINAS, J. N.; NGUYEN, P. V. β -Adrenergic Receptor Activation Facilitates Induction of a Protein Synthesis-Dependent Late Phase of Long-Term Potentiation. **The Journal of Neuroscience** v. 25, n. 13, p. 3294-3303, 2005.

GERTNER, M. J.; THOMAS, S. A. The role of norepinephrine in spatial reference and spatial working memory. **College Undergraduate Research Electronic Journal**, v. 8, p. 1-25, 2006.

GETOVA, D.; BOWERY, N. Effects of high-affinity GABAB receptor antagonists on active and passive avoidance responding in rodents with gamma-hydroxybutyrolactone-induced absence syndrome. **Psychopharmacology** v. 157, n. 1, p. 89-95, 2001.

GHANEM, K. Z. Beneficial effects of soybean protein and isoflavone extract supplementation on bone density and plasma lipids in females rats. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences** v. 57, n. 1, p. 103-108, 2007.

GIBBS, M. E. Memory systems in the chick: Regional and temporal control by noradrenaline. **Brain Research Bulletin** v. 76, n. 3, p. 170-182, 2008.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Journal of Lipid Research** v. 39, n. 8, p. 1529-1542, 1998.

GIUSTO, N. M. et al. Age-Associated Changes in Central Nervous System Glycerolipid Composition and Metabolism. **Neurochemical Research** v. 27, n. 11, p. 1513-1523, 2002.

GLENN, M. J. et al. Age-related declines in exploratory behavior and markers of hippocampal plasticity are attenuated by prenatal choline supplementation in rats. **Brain research** v. 1237, p. 110-123, 2008.

GORDON, W. C.; BAZAN, N. G. Docosahexaenoic Acid Utilization During Rod Photoreceptor Cell Renewal **The Journal of Neuroscience** v. 10, p. 2190-2202, 1990.

GOTO, S.; RADAK, Z. Implications of oxidative damage to proteins and DNA in aging and its intervention by caloric restriction and exercise. **Journal of Sport and Health Science** v. 2, n. 2, p. 75-80, 2013.

GREEN, K. N. et al. Dietary Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid Ameliorate Amyloid- β and Tau Pathology via a Mechanism Involving Presenilin 1 Levels. **The Journal of Neuroscience** v. 27, n. 16, p. 4385-4395, 2007.

GUINÉ, R.; HENRIQUES, F. O Papel dos Ácidos Gordos na Nutrição Humana e Desenvolvimentos Sobre o Modo Como Influenciam a Saúde. **Millenium** v. 40, p. 7-21, 2011.

HAIDER, S. et al. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. **AGE** v. 36, n. 3, p. 1291-1302, 2014.

HALL, R. A. β -Adrenergic receptors and their interacting proteins. **Seminars in Cell & Developmental Biology** v. 15, n. 3, p. 281-288, 2004.

HAMANI, C. et al. Memory enhancement induced by hypothalamic/fornix deep brain stimulation. **Annals of Neurology** v. 63, n. 1, p. 119-123, 2008.

HAMMOND, R. S.; TULL, L. E.; STACKMAN, R. W. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory** v. 82, n. 1, p. 26-34, 2004.

HARIK, S. I.; MCCracken, K. A. Age-related increase in presynaptic noradrenergic markers of the rat cerebral cortex. **Brain Research** v. 381, n. 1, p. 125-130, 1986.

HARRIS, H. A. Estrogen Receptor- β : Recent Lessons from in Vivo Studies. **Molecular Endocrinology** v. 21, n. 1, p. 1-13, 2007.

HARRISON, F. E. et al. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. **Learning & Memory** v. 13, n. 6, p. 809-819, 2006.

HASHIMOTO, M.; HOSSAIN, S. Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: beneficial effect of docosahexaenoic acid on cognitive decline in Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacological Sciences** v. 116, n. 2, p. 150-162, 2011.

HASHIMOTO, M. et al. n-3 fatty acids effectively improve the reference memory-related learning ability associated with increased brain docosahexaenoic acid-derived docosanoids in aged rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids** v. 1851, n. 2, p. 203-209, 2015.

HASHIMOTO, M. et al. Chronic Administration of Docosahexaenoic Acid Ameliorates the Impairment of Spatial Cognition Learning Ability in Amyloid β -Infused Rats. **The Journal of Nutrition** v. 135, n. 3, p. 549-555, 2005.

HASSELMO, M. E. The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. **Current opinion in neurobiology** v. 16, n. 6, p. 710-715, 2006.

HELENE, A. F.; XAVIER, G. F. A construção da atenção a partir da memória. **Revista Brasileira de Psiquiatria** v. 25, p. 12-20, 2003.

HENDERSON, V. W. Cognitive Changes After Menopause: Influence of Estrogen. **Clinical obstetrics and gynecology** v. 51, n. 3, p. 618-626, 2008.

_____. Gonadal Hormones and Cognitive Aging: A Midlife Perspective. **Women's health** v. 7, n. 1, p. 81-93, 2011.

HENDERSON, V. W. et al. Long-term soy isoflavone supplementation and cognition in women: A randomized, controlled trial. **Neurology** v. 78, n. 23, p. 1841-1848, 2012.

HILLMAN, G. G. et al. Differential effect of soy isoflavones in enhancing high intensity radiotherapy and protecting lung tissue in a pre-clinical model of lung carcinoma. **Radiotherapy and Oncology** v. 109, n. 1, p. 117-125, 2013.

HILLMAN, G. G. et al. Radioprotection of Lung Tissue by Soy Isoflavones. **Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer** v. 8, n. 11, p. 1356-1364, 2013.

HIROSE, A. et al. Low-dose isoflavone aglycone alleviates psychological symptoms of menopause in Japanese women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Archives of Gynecology and Obstetrics** v. 293, p. 609-615, 2016.

HO, S. C. et al. Effects of soy isoflavone supplementation on cognitive function in Chinese postmenopausal women: a double-blind, randomized, controlled trial. **Menopause** v. 14, p. 489-499, 2007.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the Elevated Plus-Maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

HOLMES, A. et al. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. **Genes, Brain and Behavior** v. 1, n. 1, p. 55-69, 2002.

HOVENS, I. B. et al. Surgery-induced behavioral changes in aged rats. **Experimental Gerontology** v. 48, n. 11, p. 1204-1211, 2013.

HU, H. et al. Emotion Enhances Learning via Norepinephrine Regulation of AMPA-Receptor Trafficking. **Cell** v. 131, n. 1, p. 160-173, 2007.

HUR, H. G. et al. Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. **Archives of Microbiology** v. 178, p. 8-12, 2002.

IBRAHIM, W. H. et al. Isoflavone-Rich Soy Isolate Reduces Lipid Peroxidation in Mouse Liver. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research** v. 78, n. 45, p. 217-222, 2008.

IVERSEN, S. D.; IVERSEN, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. **Trends in Neurosciences** v. 30, n. 5, p. 188-193, 2007.

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. **Revista USP** v. 98, p. 9-16, 2013.

JACOBSON, L. et al. Correlation of cellular changes and spatial memory during aging in rats. **Experimental Gerontology** v. 43, n. 10, p. 929-938, 2008.

JANICKI, S. C.; SCHUPF, N. Hormonal Influences on Cognition and Risk for Alzheimer Disease. **Current neurology and neuroscience reports** v. 10, n. 5, p. 359-366, 2010.

JELTSCH-DAVID, H.; KOENIG, J.; CASSEL, J.-C. Modulation of cholinergic functions by serotonin and possible implications in memory: General data and focus on 5-HT_{1A} receptors of the medial septum. **Behavioural Brain Research** v. 195, n. 1, p. 86-97, 2008.

JHA, R.; RIZVI, S. I. Age-dependent decline in erythrocyte acetylcholinesterase activity: Correlation with oxidative stress. **Biomedical Papers** v. 153, p. 195-198, 2009.

JOHN, J. A. S. et al. Associations of Urine Excretion of Isoflavonoids with Cognition in Postmenopausal Women in the Women's Isoflavone Soy Health Clinical Trial. **Journal of the American Geriatrics Society** v. 62, n. 4, p. 629-635, 2014.

KAASINEN, V. et al. Age-related dopamine D₂/D₃ receptor loss in extrastriatal regions of the human brain. **Neurobiology of Aging** v. 21, n. 5, p. 683-688, 2000.

KAISER, L. G. et al. Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: (1)H MR spectroscopy study at 4 T. **Neurobiology of aging** v. 26, n. 5, p. 665-672, 2005.

KALUEFF, A.; NUTT, D. J. Role of GABA in memory and anxiety. **Depression and Anxiety** v. 4, n. 3, p. 100-110, 1996.

KAM, P. C. A.; SEE, A. U. L. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. **Anaesthesia** v. 55, n. 5, p. 442-449, 2000.

KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSEL, T. M. **Fundamentos da Neurosciência e do Comportamento**. Rio de Janeiro: 2000.

KANE, M. J.; ENGLE, R. W. The role of prefrontal cortex in working-memory capacity, executive attention, and general fluid intelligence: An individual-differences perspective. **Psychonomic Bulletin & Review** v. 9, n. 4, p. 637-671, 2002.

KAO, Y. C. et al. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. **Environmental Health Perspectives** v. 106, n. 2, p. 85-92, 1998.

KASUGA, K. et al. Rapid Appearance of Resolvin Precursors in Inflammatory Exudates: Novel Mechanisms in Resolution. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)** v. 181, n. 12, p. 8677-8687, 2008.

KATSUKI, H.; OKUDA, S. Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. **Progress in Neurobiology** v. 46, n. 6, p. 607-636, 1995.

KEENAN, P. A. et al. Prefrontal cortex as the site of estrogen's effect on cognition. **Psychoneuroendocrinology** v. 26, n. 6, p. 577-590, 2001.

_____. Prefrontal cortex as the site of estrogen's effect on cognition. **Psychoneuroendocrinology** v. 26, n. 6, p. 577-590, 2011.

KELESHIAN, V. L. et al. Aging is associated with altered inflammatory, arachidonic acid cascade and synaptic markers, influenced by epigenetic modifications, in the human frontal cortex. **Journal of neurochemistry** v. 125, n. 1, p. 63-73, 2013.

KELLY, L. et al. The polyunsaturated fatty acids, EPA and DPA exert a protective effect in the hippocampus of the aged rat. **Neurobiology of Aging** v. 32, n. 12, p. 2318.e1-2318.e15, 2011.

KHANI, B. et al. Effect of soy phytoestrogen on metabolic and hormonal disturbance of women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences** v. 16, n. 3, p. 297-302, 2011.

KIM, H.-K. et al. Genistein Decreases Food Intake, Body Weight, and Fat Pad Weight and Causes Adipose Tissue Apoptosis in Ovariectomized Female Mice. **The Journal of Nutrition** v. 136, n. 2, p. 409-414, 2006.

KIM, H.-Y. Novel Metabolism of Docosahexaenoic Acid in Neural Cells. **Journal of Biological Chemistry** v. 282, n. 26, p. 18661-18665, 2007.

KIM, H. et al. Stereochemical analysis of hydroxylated docosahexaenoates produced by human platelets and rat brain homogenate. **Prostaglandins** v. 40, n. 5, p. 473-490, 1990.

KISHIDA, T. et al. Dietary Soy Isoflavone–Aglycone Lowers Food Intake in Female Rats With and Without Ovariectomy. **Obesity** v. 16, n. 2, p. 290-297, 2008.

KITAWAKI, R. et al. Effects of Lactobacillus Fermented Soymilk and Soy Yogurt on Hepatic Lipid Accumulation in Rats Fed a Cholesterol-Free Diet. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** v. 73, n. 7, p. 1484-1488, 2009.

KOBAYASHI, M.; EGUSA, S.; FUKUDA, M. Isoflavone and Protein Constituents of Lactic Acid-Fermented Soy Milk Combine to Prevent Dyslipidemia in Rats Fed a High Cholesterol Diet. **Nutrients** v. 6, n. 12, p. 5704-5723, 2014.

KOHARA, Y. et al. Perinatal exposure to genistein, a soy phytoestrogen, improves spatial learning and memory but impairs passive avoidance learning and memory in offspring. **Physiology & Behavior** v. 130, p. 40-46, 2014.

KOTANI, S. et al. Synaptic plasticity preserved with arachidonic acid diet in aged rats. **Neuroscience Research** v. 46, n. 4, p. 453-461, 2003.

KOTANI, S. et al. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. **Neuroscience Research** v. 56, n. 2, p. 159-164, 2006.

KREIJKAMP-KASPERS, S. et al. Dietary Phytoestrogen Intake and Cognitive Function in Older Women. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences** v. 62, n. 5, p. 556-562, 2007.

KÜÇÜK, A. et al. Effects of age and anxiety on learning and memory. **Behavioural Brain Research** v. 195, n. 1, p. 147-152, 2008.

KUDOU, S. et al. Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seeds (Glycine max Merrill). **Agricultural and Biological Chemistry** v. 55, n. 9, p. 2227-2233, 1991.

KUIPER, G. G. J. M. et al. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . **Endocrinology** v. 138, n. 3, p. 863-870, 1997.

KUIPER. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology** v. 139, n. 10, p. 4252-63, 1998.

KURZER, M. S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review of Nutrition** v. 17, p. 353-381, 1997.

KYUHO, S.-I. Preventive effects of genistein on motor dysfunction following 6-hydroxydopamine injection in ovariectomized rats. **Neuroscience Letters** v. 448, n. 1, p. 10-14, 2008.

LAGARI, V. S.; LEVIS, S. Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v. 139, p. 294-301, 2014.

LARKIN, T.; PRICE, W. E.; ASTHEIMER, L. The Key Importance of Soy Isoflavone Bioavailability to Understanding Health Benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** v. 48, n. 6, p. 538-552, 2008.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology** v. 460, n. 2, p. 525-542, 2010.

LEDOUX, J. E. Emotion Circuits in the Brain. **Annual Review of Neuroscience** v. 23, n. 1, p. 155-184, 2000.

LEE, I.; SOLIVAN, F. The roles of the medial prefrontal cortex and hippocampus in a spatial paired-association task. **Learn. Mem** v. 15, p. 357-367, 2008.

LEE, I. H.; CHOU, C.-C. Distribution Profiles of Isoflavone Isomers in Black Bean Kojis Prepared with Various Filamentous Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 54, n. 4, p. 1309-1314, 2006.

LEE, S. J. et al. Age-related changes in glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) immunoreactivity in the central nervous system of rats. **Neuroscience Letters** v. 409, n. 2, p. 134-139, 2006.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios?: conceitos fundamentais de neurociências**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

LENZE, E. J.; WETHERELL, J. L. A lifespan view of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience** v. 13, n. 4, p. 381-399, 2011.

LEPHART, E. et al. Dietary isoflavones alter regulatory behaviors, metabolic hormones and neuroendocrine function in Long-Evans male rats. **Nutrition & Metabolism** v. 1, n. 1, p. 16, 2004.

LEPHART, E. D.; SETCHELL, K. D. R.; LUND, T. D. Phytoestrogens: hormonal action and brain plasticity. **Brain Research Bulletin** v. 65, n. 3, p. 193-198, 2005.

LESLIE, J. B.; WATKINS, W. D. Eicosanoids in the central nervous system. **Journal of Neurosurgery** v. 63, n. 5, p. 659-668, 1985.

LESURTEL, M. et al. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences** v. 65, n. 6, p. 940-952, 2008.

LETIEMBRE, M. et al. Innate immune receptor expression in normal brain aging. **Neuroscience** v. 146, n. 1, p. 248-254, 2007.

LEVIS, S. et al. Soy isoflavones in the prevention of menopausal bone loss and menopausal symptoms: A randomized, double-blind trial. **Archives of Internal Medicine** v. 171, n. 15, p. 1363-1369, 2011.

LEVISON, B. S. et al. Quantification of fatty acid oxidation products using online high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Free Radical Biology and Medicine** v. 59, p. 2-13, 2013.

LIM, G. P. et al. A Diet Enriched with the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid Burden in an Aged Alzheimer Mouse Model. **The Journal of Neuroscience** v. 25, n. 12, p. 3032-3040, 2005.

LIMA, Ê. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v. 37, n. 3, p. 294-303, 2001.

LIMER, J.; SPEIRS, V. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. **Breast Cancer Res** v. 6, n. 3, p. 119 - 127, 2004.

LIU, J.; CHANG, S. K.; WIESENBORN, D. Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. **J Agric Food Chem** v. 53, n. 6, p. 2333-40, 2005.

LLANOS, A. A. et al. Effects of Tomato and Soy on Serum Adipokine Concentrations in Postmenopausal Women at Increased Breast Cancer Risk: A Cross-Over Dietary Intervention Trial. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 99, n. 2, p. 625-632, 2014.

LOERCH, P. M. et al. Evolution of the Aging Brain Transcriptome and Synaptic Regulation. **PLoS ONE** v. 3, n. 10, p. e3329, 2008.

LORENZI, D. R. S. D. et al. Assistência à mulher climatérica: novos paradigmas. **Revista Brasileira de Enfermagem** v. 62, p. 287-293, 2009.

LU, K. H. et al. Chronological Changes in Sex Steroid, Gonadotropin and Prolactin Secretion in Aging Female Rats Displaying Different Reproductive States. **Biology of Reproduction** v. 21, n. 1, p. 193-203, 1979.

LU, Y.; CHRISTIAN, K.; LU, B. BDNF: A Key Regulator for Protein-synthesis Dependent LTP and Long-term Memory? **Neurobiology of learning and memory** v. 89, n. 3, p. 312-323, 2008.

LUCHTMAN, D. W.; SONG, C. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: Findings from animal and clinical studies. **Neuropharmacology** v. 64, p. 550-565, 2013.

LUINE, V. et al. Dietary phytoestrogens enhance spatial memory and spine density in the hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized rats. **Brain Research** v. 1126, n. 1, p. 183-187, 2006.

LUINE, V. N. Estradiol and cognitive function: Past, present and future. **Hormones and Behavior** v. 66, n. 4, p. 602-618, 2014.

LUND, T. et al. Visual spatial memory is enhanced in female rats (but inhibited in males) by dietary soy phytoestrogens. **BMC Neuroscience** v. 2, n. 1, p. 20, 2001.

LUND, T. D. et al. Equol an isoflavonoid: potential for improved prostate health, in vitro and in vivo evidence. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E** v. 9, p. 4-4, 2011.

LUND, T. D.; LEPHART, E. D. Dietary soy phytoestrogens produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze. **Brain Research** v. 913, n. 2, p. 180-184, 2001.

LUNDHT, T. Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** v. 208, p. 33-39, 1995.

LYDIARD, R. B. The role of GABA in anxiety disorders. **J Clin Psychiatry** v. 64, p. 21-27, 2003.

LYNCH, A. M. et al. Eicosapentaenoic acid confers neuroprotection in the amyloid-beta challenged aged hippocampus. **Neurobiology of Aging** v. 28, n. 6, p. 845-855, 2007.

MA, S. Y. et al. Dopamine transporter-immunoreactive neurons decrease with age in the human substantia nigra. **The Journal of Comparative Neurology** v. 409, n. 1, p. 25-37, 1999.

MACHADO, A.; CANO, J.; SANTIAGO, M. The change with age in biogenic amines and their metabolites in the striatum of the rat. **Archives of Gerontology and Geriatrics** v. 5, n. 4, p. 333-342, 1986.

MAREN, S. Neurobiology of pavlovian fear conditioning. **Annual Review of Neuroscience** v. 24, n. 1, p. 897-931, 2001.

MARSMAN, A. et al. Glutamate changes in healthy young adulthood. **European Neuropsychopharmacology** v. 23, n. 11, p. 1484-1490, 2013.

MARSMAN, A. et al. Glutamate in Schizophrenia: A Focused Review and Meta-Analysis of (1)H-MRS Studies. **Schizophrenia Bulletin** v. 39, n. 1, p. 120-129, 2013.

MARTIN, D. S. D. et al. Long-term potentiation in aged rats is restored when the age-related decrease in polyunsaturated fatty acid concentration is reversed. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** v. 67, n. 2, p. 121-130, 2002.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, K.; NOREMBERG, M. Glutamine synthetase: glial localization in brain. **Science** v. 195, n. 4284, p. 1356-1358, 1977.

MARTINEZ, A. P. C. et al. Alterações químicas em grãos de soja com a germinação. **Food Science and Technology** v. 31, p. 23-30, 2011.

MASILAMANI, M.; WEI, J.; SAMPSON, H. A. Regulation of the immune response by soybean isoflavones. **Immunologic Research** v. 54, n. 1-3, p. 95-110, 2012.

MATTHIES, A. et al. Conversion of Daidzein and Genistein by an Anaerobic Bacterium Newly Isolated from the Mouse Intestine. **Applied and Environmental Microbiology** v. 74, n. 15, p. 4847-4852, 2008.

MATTSON, M. P. Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 1144, p. 97-112, 2008.

MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences** v. 27, n. 10, p. 589-594, 2004.

MCENTEE, W.; CROOK, T. Serotonin, memory, and the aging brain. **Psychopharmacology** v. 103, n. 2, p. 143-149, 1991.

MCGAHON, B.; CLEMENTS, M. P.; LYNCH, M. A. The ability of aged rats to sustain long-term potentiation is restored when the age-related decrease in membrane arachidonic acid concentration is reversed. **Neuroscience** v. 81, n. 1, p. 9-16, 1997.

MCGAHON, B. M. et al. Age-related changes in synaptic function: analysis of the effect of dietary supplementation with ω -3 fatty acids. **Neuroscience** v. 94, n. 1, p. 305-314, 1999.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 21, n. 6, p. 208-210, 2000.

MCNAMARA, R. K. et al. The aging human orbitofrontal cortex: Decreasing polyunsaturated fatty acid composition and associated increases in lipogenic gene expression and stearoyl-CoA desaturase activity. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** v. 78, n. 4–5, p. 293-304, 2008.

MCQUAIL, J. A.; FRAZIER, C. J.; BIZON, J. L. Molecular aspects of age-related cognitive decline: the role of GABA signaling. **Trends in molecular medicine** v. 21, n. 7, p. 450-460, 2015.

MEI, Y. et al. Aging-associated formaldehyde-induced norepinephrine deficiency contributes to age-related memory decline. **Aging Cell** v. 14, n. 4, p. 659-668, 2015.

MENESES, A.; LIY-SALMERON, G. Serotonin and emotion, learning and memory. v. 23, n. 5-6, p. 543, 2012.

MERRITT, K.; MCGUIRE, P.; EGERTON, A. Relationship between Glutamate Dysfunction and Symptoms and Cognitive Function in Psychosis. **Frontiers in Psychiatry** v. 4, p. 151, 2013.

MEYZA, K. Z. et al. Age increases anxiety and reactivity of the fear/anxiety circuit in Lewis rats. **Behavioural Brain Research** v. 225, n. 1, p. 192-200, 2011.

MICHELS, L. et al. Frontal GABA Levels Change during Working Memory. **PLoS ONE** v. 7, n. 4, p. e31933, 2012.

MÍGUEZ, J. M. et al. Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. **Journal of Neural Transmission** v. 106, n. 11-12, p. 1089-1098, 1999.

MISHRA, G. D.; DOBSON, A. J. Using longitudinal profiles to characterize women's symptoms through midlife: results from a large prospective study. **Menopause** v. 19, n. 5, p. 549-555, 2012.

MISSALE, C. et al. Dopamine Receptors: From Structure to Function. **Physiological Reviews** v. 78, n. 1, p. 189-225, 1998.

MITRA, S. W. et al. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. **Endocrinology** v. 144, n. 5, p. 2055-67, 2003.

MOHAMMAD-ZADEH, L. F.; MOSES, L.; GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin: a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics** v. 31, n. 3, p. 187-199, 2008.

MOHLMAN, J. et al. Improving recognition of late life anxiety disorders in Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition: observations and recommendations of the Advisory Committee to the Lifespan Disorders Work Group. **International journal of geriatric psychiatry** v. 27, n. 6, p. 549-556, 2012.

MOLOCHKINA, E. M. et al. H₂O₂ modifies membrane structure and activity of acetylcholinesterase. **Chemico-Biological Interactions** v. 157–158, p. 401-404, 2005.

MOORTHY, K. et al. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. **Experimental Gerontology** v. 40, n. 4, p. 295-302, 2005.

MORAES, A. B. et al. The effects of topical isoflavones on postmenopausal skin: Double-blind and randomized clinical trial of efficacy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** v. 146, n. 2, p. 188-192, 2009.

MORAES, E. N. **Princípios Básicos de Geriatria e Gerontologia**. Belo Horizonte: 2008.

MORAES, R. M. A. D. et al. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 41, p. 715-729, 2006.

MORCOM, A. M. et al. Memory Encoding and Dopamine in the Aging Brain: A Psychopharmacological Neuroimaging Study. **Cerebral Cortex (New York, NY)** v. 20, n. 3, p. 743-757, 2010.

MOREL, G. R. et al. Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal hippocampus of very old female rats. **Neuroscience** v. 303, p. 189-199, 2015.

MOSCOVITCH, M. et al. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. **Journal of Anatomy** v. 207, n. 1, p. 35-66, 2005.

MUELLER, S. O. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. **Journal of Chromatography B** v. 777, n. 1–2, p. 155-165, 2002.

MUKHERJEE, J. et al. Brain imaging of 18F-fallypride in normal volunteers: Blood analysis, distribution, test-retest studies, and preliminary assessment of sensitivity to aging effects on dopamine D-2/D-3 receptors. **Synapse** v. 46, n. 3, p. 170-188, 2002.

MULUGETA, S. et al. Identification and absolute configuration of dihydroxy-arachidonic acids formed by oxygenation of 5S-HETE by native and aspirin-acetylated COX-2. **Journal of Lipid Research** v. 51, n. 3, p. 575-585, 2010.

MURPHY, P. A.; FARMAKALIDIS, E.; JOHNSON, L. D. Isoflavone content of soya-based laboratory animal diets. **Food and Chemical Toxicology** v. 20, n. 3, p. 315-317, 1982.

NAHAS, E. A. P. et al. Efficacy and safety of a soy isoflavone extract in postmenopausal women: A randomized, double-blind, and placebo-controlled study. **Maturitas** v. 58, n. 3, p. 249-258, 2007.

NAPPI, R. E.; KOKOT-KIEREPA, M. Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes (VIVA) – results from an international survey. **Climacteric** v. 15, n. 1, p. 36-44, 2012.

NEESE, S. L. et al. Effects of Multiple Daily Genistein Treatments on Delayed Alternation and a Differential Reinforcement of Low Rates of Responding Task in Middle-Aged Rats. **Neurotoxicology and Teratology** v. 34, n. 1, p. 187-195, 2012.

NEESE, S. L. et al. The effects of dietary treatment with S-equol on learning and memory processes in middle-aged ovariectomized rats. **Neurotoxicology and Teratology** v. 41, p. 80-88, 2014.

NEESE, S. L. et al. Impact of dietary genistein and aging on executive function in rats. **Neurotoxicology and Teratology** v. 32, n. 2, p. 200-211, 2010.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 338, n. 1, p. 668-676, 2005.

NILSSON, S. et al. Mechanisms of Estrogen Action. **Physiological Reviews** v. 81, n. 4, p. 1535-1565, 2001.

NISHIYAMA, M. et al. Localization of Arachidonate 12-Lipoxygenase in Canine Brain Tissues. **Journal of Neurochemistry** v. 58, n. 4, p. 1395-1400, 1992.

NISHIYAMA, M. et al. Arachidonate 12-lipoxygenase is localized in neurons, glial cells, and endothelial cells of the canine brain. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry** v. 41, n. 1, p. 111-117, 1993.

NISHIZAKI, T. et al. Arachidonic Acid as a Messenger for the Expression of Long-Term Potentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 254, n. 2, p. 446-449, 1999.

NORMAN, G.; EACOTT, M. J. Dissociable Effects of Lesions to the Perirhinal Cortex and the Postrhinal Cortex on Memory for Context and Objects in Rats. **Behavioral Neuroscience** v. 119, n. 2, p. 557-566, 2005.

OCCHIUTO, F. et al. The phytoestrogenic isoflavones from *Trifolium pratense* L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity. **Phytomedicine** v. 15, n. 9, p. 676-682, 2008.

OGAWA, S. et al. Estrogen Increases Locomotor Activity in Mice through Estrogen Receptor α : Specificity for the Type of Activity. **Endocrinology** v. 144, n. 1, p. 230-239, 2003.

OHNO, S. et al. Flavonoid inhibition of overexpressed human 3β -hydroxysteroid dehydrogenase type II. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v. 88, n. 2, p. 175-182, 2004.

OJEDA, S. R. et al. The Role of Arachidonic Acid and Its Metabolites in the Release of Neuropeptides. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 559, n. 1, p. 192-207, 1989.

OLVERA-CORTÉS, M. E. et al. Serotonin/dopamine interaction in learning. **Progress in Brain Research** v. 172, p. 567-602, 2008.

OTTONI, E. EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers** v. 32, n. 3, p. 446-449, 2000.

OUYANG, G. et al. Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoint pathways. **Cell Biology International** v. 33, n. 12, p. 1237-1244, 2009.

PALOMARES-CASTILLO, E. et al. The intercalated paracapsular islands as a module for integration of signals regulating anxiety in the amygdala. **Brain Research** v. 1476, p. 211-234, 2012.

PAN, M. et al. Effects of genistein and daidzein on hippocampus neuronal cell proliferation and BDNF expression in H19-7 neural cell line. **The journal of nutrition, health & aging** v. 16, n. 4, p. 389-394, 2012.

PAPANDREOU, M. A. et al. Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. **Behavioural Brain Research** v. 219, n. 2, p. 197-204, 2011.

PARASKEVI, M. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. **Hormones** v. 6, n. 3, p. 173-193, 2007.

PARENTE, M. A. M. **Cognição e Envelhecimento**. 2006. 312.

PASKULIN, L. M. G. et al. Aging, diversity, and health: the Brazilian and the Canadian context. **Acta Paulista de Enfermagem** v. 24, p. 851-856, 2011.

PATISAUL, H. B.; FORTINO, A. E.; POLSTON, E. K. ex differences in serotonergic but not gamma-aminobutyric acidergic (GABA) projections to the rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. **Endocrinology** v. 149, p. 397-408, 2008.

PATISAUL, H. B.; JEFFERSON, W. The pros and cons of phytoestrogens. **Frontiers in neuroendocrinology** v. 31, n. 4, p. 400-419, 2010.

PEDERSEN, S. B. et al. Demonstration of estrogen receptor subtypes α and β in human adipose tissue: influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 182, n. 1, p. 27-37, 2001.

PEDIGO, N. W. et al. Benzodiazepine receptor binding in young, mature and senescent rat brain and kidney. **Neurobiology of Aging** v. 2, n. 2, p. 83-88, 1981.

PELEG-RAIBSTEIN, D. et al. Activation of dopaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex by N-methyl-D-aspartate stimulation of the ventral hippocampus in rats. **Neuroscience** v. 132, n. 1, p. 219-232, 2005.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods** v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

PERROT-SINAL, T. S. et al. Sex differences in performance in the Morris water maze and the effects of initial nonstationary hidden platform training. **Behavioral Neuroscience** v. 110, n. 6, p. 1309-1320, 1996.

PETERS, R. Ageing and the brain. **Postgraduate Medical Journal** v. 82, p. 84-88, 2006.

PHILLIS, J. W.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. **Brain Research Reviews** v. 52, n. 2, p. 201-243, 2006.

PICQ, M. et al. DHA Metabolism: Targeting the Brain and Lipoxygenation. **Molecular Neurobiology** v. 42, n. 1, p. 48-51, 2010.

PIETRELLI, A. et al. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. **Neuroscience** v. 202, n. 0, p. 252-266, 2012.

PILŠÁKOVÁ L. et al. Missing evidence for the effect one-week phytoestrogen-rich diet on mental rotation in two dimensions. **Neuroendocrinology Letters** v. 30, n. 1, p. 125-130, 2009.

PILŠÁKOVÁ, L.; RIEČANSKÝ, I.; JAGLA, F. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. **Physiological Research** v. 59, n. 5, p. 651-664, 2010.

PIOMELLI, D. et al. Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia sensory cells. **Nature** v. 328, n. 6125, p. 38-43, 1987.

PLOURDE, M. et al. Plasma incorporation, apparent retroconversion and β -oxidation of (13)C-docosahexaenoic acid in the elderly. **Nutrition & Metabolism** v. 8, p. 5-5, 2011.

POLITO, F. et al. Genistein aglycone, a soy-derived isoflavone, improves skin changes induced by ovariectomy in rats. **British Journal of Pharmacology** v. 165, n. 4, p. 994-1005, 2012.

POMPL, P. N. et al. Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APPSW transgenic mouse model for Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience Methods** v. 87, n. 1, p. 87-95, 1999.

PONZIO F. et al. Changes in monoamines and their metabolite levels in some brain regions of aged rats. **Neurobiology Aging** v. 3 n. 1, p. 23-29, 1982.

PRESTON, ALISON R.; EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. **Current Biology** v. 23, n. 17, p. 764-773, 2013.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology** v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

RAININKO, R.; MATTSSON, P. Metabolite concentrations in supraventricular white matter from teenage to early old age: A short echo time 1h magnetic resonance spectroscopy (MRS) study. **Acta Radiologica** v. 51, n. 3, p. 309-315, 2010.

RANGANATH, C.; BLUMENFELD, R. S. Doubts about double dissociations between short- and long-term memory. **Trends in Cognitive Sciences** v. 9, n. 8, p. 374-380, 2005.

RAO, J. S.; RAPOPORT, S. I.; KIM, H. W. Altered neuroinflammatory, arachidonic acid cascade and synaptic markers in postmortem Alzheimer's disease brain. **Translational Psychiatry** v. 1, n. 8, p. e31, 2011.

RAPOPORT, S. I. In Vivo Fatty Acid Incorporation into Brain Phospholipids in Relation to Signal Transduction and Membrane Remodeling. **Neurochemical Research** v. 24, n. 11, p. 1403-1415, 1999.

RESNICK, S. M. et al. Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Studies of Older Adults: A Shrinking Brain. **The Journal of Neuroscience** v. 23, n. 8, p. 3295-3301, 2003.

RIMBACH, G. et al. Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease – A molecular perspective. **Food and Chemical Toxicology** v. 46, n. 4, p. 1308-1319, 2008.

RISSMAN, R. A.; MOBLEY, W. C. Implication for treatment: GABA(A) receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry** v. 117, n. 4, p. 613-622, 2011.

RISSMAN, R. A. et al. Age-related alterations in GABAA receptor subunits in the nonhuman primate hippocampus. **Brain Research** v. 1073–1074, p. 120-130, 2006.

ROBINSON, L. J. et al. A meta-analysis of cognitive deficits in euthymic patients with bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders** v. 93, n. 1, p. 105-115, 2006.

ROBINSON, O. J. et al. The impact of anxiety upon cognition: perspectives from human threat of shock studies. **Frontiers in Human Neuroscience** v. 7, p. 203, 2013.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

RODRÍGUEZ-LANDA, J. F. et al. Anxiolytic-like effect of phytoestrogen genistein in rats with long-term absence of ovarian hormones in the black and white model. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** v. 33, n. 2, p. 367-372, 2009.

RODRIGUEZ DE TURCO, E. B. et al. Systemic fatty acid responses to transient focal cerebral ischemia: influence of neuroprotectant therapy with human albumin. **Journal of Neurochemistry** v. 83, n. 3, p. 515-524, 2002.

ROGERS, J. L.; KESNER, R. P. Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. **Neurobiology of Learning and Memory** v. 80, n. 3, p. 332-342, 2003.

ROIG-PÉREZ, S. et al. Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine. **Journal of Lipid Research** v. 45, n. 8, p. 1418-1428, 2004.

ROSENFELD, C. S.; FERGUSON, S. A. Barnes Maze Testing Strategies with Small and Large Rodent Models. **Journal of visualized experiments: Jove**, n. 84, p. e51194, 2014.

ROSENZWEIG, E. S.; BARNES, C. A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. **Progress in Neurobiology** v. 69, n. 3, p. 143-179, 2003.

ROSETH, S.; FYKSE, E. M.; FONNUM, F. The effect of arachidonic acid and free fatty acids on vesicular uptake of glutamate and γ -aminobutyric acid. **European Journal of Pharmacology** v. 341, n. 2-3, p. 281-288, 1998.

ROSSATO, J. I. et al. Dopamine Controls Persistence of Long-Term Memory Storage. **Science** v. 325, n. 5943, p. 1017-1020, 2009.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** v. 48, p. 227-233, 2004.

ROSTAMI, P.; HAJIZADEH-MOGHADDAM, A.; ZARRINDAST, M.-R. The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviours. **Physiology & Behavior** v. 87, n. 5, p. 891-896, 2006.

ROWLAND, I. et al. Bioavailability of phyto-oestrogens. **The British Journal of Nutrition** v. 89, p. 45-58, 2003.

RUANO, D. et al. Aging-Associated Changes in the Pharmacological Properties of the Benzodiazepine (ω) Receptor Isoforms in the Rat Hippocampus. **Journal of Neurochemistry** v. 64, n. 2, p. 867-873, 1995.

RUEHR, M. L.; ZHANG, L.; DORMAN, R. V. Lipid-Dependent Modulation of Ca^{2+} Availability in Isolated Mossy Fiber Nerve Endings. **Neurochemical Research** v. 22, n. 10, p. 1215-1222, 1997.

RÜFER, C. E.; KULLING, S. E. Antioxidant Activity of Isoflavones and Their Major Metabolites Using Different in Vitro Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 54, n. 8, p. 2926-2931, 2006.

RUIZ-LARREA, M. B. et al. Antioxidant Activity of Phytoestrogenic Isoflavones. **Free Radical Research** v. 26, n. 1, p. 63-70, 1997.

RUIZ-MEDINA, J. et al. Intracranial self-stimulation facilitates a spatial learning and memory task in the Morris water maze. **Neuroscience** v. 154, n. 2, p. 424-430, 2008.

RUSSO-NEUSTADT, A. Brain-derived neurotrophic factor, behavior, and new directions for the treatment of mental disorders. **Seminars in clinical neuropsychiatry** v. 8, n. 2, p. 109-118, 2003.

RUSSO, G. L. Dietary n – 6 and n – 3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology** v. 77, n. 6, p. 937-946, 2009.

RYAN, L. et al. Hippocampal Activation during Episodic and Semantic Memory Retrieval: Comparing Category Production and Category Cued Recall. **Neuropsychologia** v. 46, n. 8, p. 2109-2121, 2008.

SACKS, F. M. et al. Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health. **An American Heart Association Science Advisory for Professionals From the Nutrition Committee** v. 113, n. 7, p. 1034-1044, 2006.

SAFAHANI, M. et al. Effect of Different Doses of Soy Isoflavones on Spatial Learning and Memory in Ovariectomized Rats. **Basic and Clinical Neuroscience** v. 2, n. 4, p. 12-18, 2011.

SAIED, N. M.; HASSAN, W. A. Long-term exposure to xenoestrogens alters some brain monoamines and both serum thyroid hormones and cortisol levels in adult male rats. **The Journal of Basic & Applied Zoology** v. 67, n. 5, p. 205-211, 2014.

SALEEM, S. et al. Senescence related alteration in hippocampal biogenic amines produces neuropsychological deficits in rats. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 27, n. 4, p. 837-845, 2014.

SARKAKI A et al. Preventive effects of soy meal (+/- isoflavone) on spatial cognitive deficiency and body weight in an ovariectomized animal model of Parkinson's disease. **Pakistan Journal of Biological Sciences** v. 12, n. 20, p. 1338-1345, 2009.

SCAHILL, R. I. et al. A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. **Archives of Neurology** v. 60, n. 7, p. 989-994, 2003.

SCHACTER, D. L.; BADGAIYAN, R. D. Neuroimaging of priming: New perspectives on implicit and explicit memory. **Current Directions in Psychological Science** v. 10, n. 1, p. 1-4, 2001.

SCHAEFER, E. J. et al. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and alzheimer disease: The framingham heart study. **Archives of Neurology** v. 63, n. 11, p. 1545-1550, 2006.

SCHMIDT, F. et al. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines. **Oncology Reports** v. 19, n. 4, p. 1061-6, 2008.

SCHMIDT, W. J.; BUBSER, M.; HAUBER, W. Behavioural pharmacology of glutamate in the basal ganglia. **Journal of Neural Transmission** v. 38, p. 65-89, 1992.

SCHNEIDER, R. H.; IRIGARAY, T. Q. O envelhecimento na atualidade: aspectos cronológicos, biológicos, psicológicos e sociais. **Estudos de Psicologia (Campinas)** v. 25, p. 585-593, 2008.

SCHOEFER, L. et al. Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. **FEMS Microbiology Letters** v. 208, n. 2, p. 197-202, 2002.

SCHWARZ, LINDSAY A.; LUO, L. Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. **Current Biology** v. 25, n. 21, p. R1051-R1056, 2015.

SEGOVIA, G. et al. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mechanisms of Ageing and Development** v. 122, n. 1, p. 1-29, 2001.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International Journal of Preventive Medicine** v. 4, n. 6, p. 624-630, 2013.

SERHAN, C. N. et al. Resolvins: A Family of Bioactive Products of Omega-3 Fatty Acid Transformation Circuits Initiated by Aspirin Treatment that Counter Proinflammation Signals. **The Journal of Experimental Medicine** v. 196, n. 8, p. 1025-1037, 2002.

SETCHELL, K. D. R. et al. Bioavailability of Pure Isoflavones in Healthy Humans and Analysis of Commercial Soy Isoflavone Supplements. **The Journal of Nutrition** v. 131, n. 4, p. 1362S-1375S, 2001.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol - A clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. **Journal of Nutrition** v. 132, n. 12, p. 3577-3584, 2002.

SETCHELL, K. D. R. et al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 76, n. 2, p. 447-453, 2002.

SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition** v. 129, n. 3, p. 758S-767S, 1999.

SETCHELL, K. D. R.; CLERICI, C. Equol: History, Chemistry, and Formation. **Journal of Nutrition** v. 140, n. 7, p. 1355S-1362S, 2010.

SETCHELL, K. D. R. et al. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 77, n. 2, p. 411-419, 2003.

SHANMUGAN, S.; EPPERSON, C. N. Estrogen and the Prefrontal Cortex: Towards A New Understanding of Estrogen's Effects on Executive Functions in the Menopause Transition. **Human brain mapping** v. 35, n. 3, p. 847-865, 2014.

SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sciences** v. 87, n. 17–18, p. 521-536, 2010.

SHELDON, A. L.; ROBINSON, M. B. The Role of Glutamate Transporters in Neurodegenerative Diseases and Potential Opportunities for Intervention. **Neurochemistry international** v. 51, n. 6-7, p. 333-355, 2007.

SHELNUTT, S. R. et al. Urinary Pharmacokinetics of the Glucuronide and Sulfate Conjugates of Genistein and Daidzein. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention** v. 9, n. 4, p. 413-419, 2000.

SHIMIZU, T.; WOLFE, L. S. Arachidonic Acid Cascade and Signal Transduction. **Journal of Neurochemistry** v. 55, n. 1, p. 1-15, 1990.

SHUGHRUE, P. J.; MERCHENTHALER, I. Distribution of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology** v. 436, n. 1, p. 64-81, 2001.

SILVA, W. C. N. D. et al. D1/D5 dopamine receptors modulate spatial memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory** v. 97, n. 2, p. 271-275, 2012.

SIMONS, A. L. et al. Human Gut Microbial Degradation of Flavonoids: Structure–Function Relationships. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 53, n. 10, p. 4258-4263, 2005.

SINGH, M. Essential fatty acids, DHA and human brain. **The Indian Journal of Pediatrics** v. 72, n. 3, p. 239-242, 2005.

SINN, N. et al. Effects of n-3 fatty acids, EPA v. DHA, on depressive symptoms, quality of life, memory and executive function in older adults with mild cognitive impairment: a 6-month randomised controlled trial. **British Journal of Nutrition** v. 107, n. 11, p. 1682-1693, 2012.

SIRIWARDHANA, N. et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry** v. 24, n. 4, p. 613-623, 2013.

SMITH, W. L.; MURPHY, R. C. Oxidized Lipids Formed Non-enzymatically by Reactive Oxygen Species. **The Journal of Biological Chemistry** v. 283, n. 23, p. 15513-15514, 2008.

SMYTHIES, J. Section III. The Norepinephrine System. In: (Ed.). **International Review of Neurobiology**: Academic Press, v. Volume 64, 2005. p.173-211.

SÖDERBERG, M. et al. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. **Lipids** v. 26, n. 6, p. 421, 1991.

SONI, M. et al. Phytoestrogens and cognitive function: a review. **Maturitas** v. 77, n. 3, p. 209-220, 2014.

SORIANO-MAS, C. et al. Post-training intracranial self-stimulation facilitates a hippocampus-dependent task. **Behavioural Brain Research** v. 160, n. 1, p. 141-147, 2005.

SOUZA, M. M. **Memória de curta e longa duração: mecanismos independentes**. 2001. 141f Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SPECTOR, A. A. Essentiality of fatty acids. **Lipids** v. 34, n. 1, p. S1-S3, 1999.

STARKEY, N. J.; BRIDGES, N. J. The effects of acute, chronic and withdrawn progesterone in male and female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) in two tests of anxiety. **Behavioural Brain Research** v. 207, n. 2, p. 490-499, 2010.

SUZUKI, H. et al. Rapid incorporation of docosahexaenoic acid from dietary sources into brain microsomal, synaptosomal and mitochondrial membranes in adult mice. **Int J Vitam Nutr Res.** v. 67, p. 272-278, 1997.

SZKUDELSKA, K.; NOGOWSKI, L.; SZKUDELSKI, T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v. 75, n. 4–5, p. 265-271, 2000.

_____. Genistein, a plant-derived isoflavone, counteracts the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v. 109, n. 1–2, p. 108-114, 2008.

TAKASHIMA, A. et al. Declarative memory consolidation in humans: A prospective functional magnetic resonance imaging study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 103, n. 3, p. 756-761, 2006.

TANAKA, K. et al. Effects of Docosahexaenoic Acid on Neurotransmission. **Biomolecules & Therapeutics** v. 20, n. 2, p. 152-157, 2012.

TAXVIG, C. et al. Effects of Nutrition Relevant Mixtures of Phytoestrogens on Steroidogenesis, Aromatase, Estrogen, and Androgen Activity. **Nutrition and Cancer** v. 62, n. 1, p. 122-131, 2009.

TE VELDE, E. R.; PEARSON, P. L. The variability of female reproductive ageing. **Human Reproduction Update** v. 8, n. 2, p. 141-154, 2002.

TEEKACHUNHATEAN, S.; HANPRASERTPONG, N.; TEEKACHUNHATEAN, T. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds Grown in Thailand. **International Journal of Agronomy** v. 2013, p. 11, 2013.

THAM, D. M.; GARDNER, C. D.; HASKELL, W. L. Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence¹. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 83, n. 7, p. 2223-2235, 1998.

THOMAS, M. H. et al. Dietary arachidonic acid as a risk factor for age-associated neurodegenerative diseases: Potential mechanisms. **Biochimie** v. 130, p. 168-177, 2016.

TODAKA, E. et al. Fetal exposure to phytoestrogens—The difference in phytoestrogen status between mother and fetus. **Environmental Research** v. 99, n. 2, p. 195-203, 2005.

TODOROVIC, C. et al. Correlation between age-related changes in open field behavior and plaque forming cell response in da female rats. **International Journal of Neuroscience** v. 113, n. 9, p. 1259-1273, 2003.

TOLLESON, W. H. et al. Metabolism of Biochanin A and Formononetin by Human Liver Microsomes in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 50, n. 17, p. 4783-4790, 2002.

TOMAZ, C. Psicobiologia da memória. **Psicologia USP** v. 4, p. 49-59, 1993.

TORRE-VILLALVAZO, I. et al. Soy Protein Ameliorates Metabolic Abnormalities in Liver and Adipose Tissue of Rats Fed a High Fat Diet. **The Journal of Nutrition** v. 138, n. 3, p. 462-468, 2008.

TRONSON, N. C. et al. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. **Nature Neuroscience** v. 9, n. 2, p. 167-169, 2006.

TSUKAMOTO, C. et al. Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds: Changes in Isoflavones, Saponins, and Composition of Fatty Acids at Different Temperatures during Seed Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 43, n. 5, p. 1184-1192, 1995.

TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. **Molecular Brain** v. 3, n. 1, p. 15, 2010.

TULVING, E. Episodic memory and common sense: how far apart? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences** v. 356, n. 1413, p. 1505-1515, 2001.

_____. Episodic Memory: From Mind to Brain. **Annual Review of Psychology** v. 53, n. 1, p. 1-25, 2002.

VAKHAPOVA, V. et al. Phosphatidylserine Containing Omega-3 Fatty Acids May Improve Memory Abilities in Nondemented Elderly Individuals with Memory Complaints: Results from an Open-Label Extension Study. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders** v. 38, n. 1-2, p. 39-45, 2014.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 24, n. 1, p. 125-132, 2000.

VAN STEGEREN, A. H. The role of the noradrenergic system in emotional memory. **Acta Psychologica** v. 127, n. 3, p. 532-541, 2008.

VENERO, J. L.; MACHADO, A.; CANO, J. Turnover of Dopamine and Serotonin and Their Metabolites in the Striatum of Aged Rats. **Journal of Neurochemistry** v. 56, n. 6, p. 1940-1948, 1991.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Revista de Saúde Pública** v. 43, n. 3, p. 548-554, 2009.

VIGETA, S. M. G.; BRÊTAS, A. C. P. A experiência da perimenopausa e pós-menopausa com mulheres que fazem uso ou não da terapia de reposição hormonal. **Cadernos de Saúde Pública** v. 20, p. 1682-1689, 2004.

VOLCHEGORSKII, I. A. et al. The Age Dynamics of Monoamine Oxidase Activity and Levels of Lipid Peroxidation Products in the Human Brain. **Neuroscience and Behavioral Physiology** v. 34, n. 4, p. 303-305, 2004.

VOLKOW, N. D. et al. Association Between Decline in Brain Dopamine Activity With Age and Cognitive and Motor Impairment in Healthy Individuals. **American Journal of Psychiatry** v. 155, n. 3, p. 344-349, 1998.

WAHAJUDDIN et al. Disposition of Pharmacologically Active Dietary Isoflavones in Biological Systems. **Current Drug Metabolism** v. 14, n. 4, p. 369-380, 2013.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. A Review and Update of Mechanisms of Estrogen in the Hippocampus and Amygdala for Anxiety and Depression Behavior. **Neuropsychopharmacology** v. 31, n. 6, p. 1097-1111, 2006.

WALL, P. M. et al. Infralimbic D2 receptor influences on anxiety-like behavior and active memory/attention in CD-1 mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** v. 27, n. 3, p. 395-410, 2003.

WALL, R. et al. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutrition Reviews** v. 68, n. 5, p. 280-289, 2014.

WALLE, T. et al. Flavonoid Glucosides Are Hydrolyzed and Thus Activated in the Oral Cavity in Humans. **The Journal of Nutrition** v. 135, n. 1, p. 48-52, 2005.

WANG, D. et al. The Allosteric Potentiation of Nicotinic Acetylcholine Receptors by Galantamine Ameliorates the Cognitive Dysfunction in Beta Amyloid25-35 I.c.v.-Injected Mice: Involvement of Dopaminergic Systems. **Neuropsychopharmacology** v. 32, n. 6, p. 1261-1271, 2006.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 42, n. 8, p. 1666-1673, 1994.

WANG, W. et al. Sustained β 1-Adrenergic Stimulation Modulates Cardiac Contractility by Ca^{2+} /Calmodulin Kinase Signaling Pathway. **Circulation Research** v. 95, n. 8, p. 798-806, 2004.

WANG, X.-J. Synaptic Basis of Cortical Persistent Activity: the Importance of NMDA Receptors to Working Memory. **The Journal of Neuroscience** v. 19, n. 21, p. 9587-9603, 1999.

WANG, Y. et al. Age-dependent decline of dopamine D1 receptors in human brain: A PET study. **Synapse** v. 30, n. 1, p. 56-61, 1998.

WANGEN, K. E. et al. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 73, n. 2, p. 225-231, 2001.

WATABE, A. M.; ZAKI, P. A.; O'DELL, T. J. Coactivation of β -Adrenergic and Cholinergic Receptors Enhances the Induction of Long-Term Potentiation and Synergistically Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in the Hippocampal CA1 Region. **The Journal of Neuroscience** v. 20, n. 16, p. 5924-5931, 2000.

WATANABE, S. et al. Pharmacokinetics of Soybean Isoflavones in Plasma, Urine and Feces of Men after Ingestion of 60 g Baked Soybean Powder (Kinako). **The Journal of Nutrition** v. 128, n. 10, p. 1710-1715, 1998.

WATSON, C. S. et al. Estrogens of multiple classes and their role in mental health disease mechanisms. **International Journal of Women's Health** v. 2, p. 153-166, 2010.

WEBER, M. T.; MAKI, P. M.; MCDERMOTT, M. P. Cognition and mood in perimenopause: A systematic review and meta-analysis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v. 142, p. 90-98, 2014.

WEINERT, B. T.; TIMIRAS, P. S. Invited Review: Theories of aging. **Journal of Applied Physiology** v. 95, n. 4, p. 1706-1716, 2003.

WEISER, M. J.; BUTT, C. M.; MOHAJERI, M. H. Docosahexaenoic Acid and Cognition throughout the Lifespan. **Nutrients** v. 8, n. 2, p. 99, 2016.

WETHERELL, J. L. et al. Anxiety, Cognitive Performance, and Cognitive Decline in Normal Aging. **The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences** v. 57, n. 3, p. 246-255, 2002.

WILKINSON, A. P. et al. Hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase is the first step in the uptake of daidzein glucosides by rat small intestine in vitro. **Xenobiotica** v. 33, n. 3, p. 255-264, 2003.

WILSON, M. E. et al. Age differentially influences estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) gene expression in specific regions of the rat brain. **Mechanisms of Ageing and Development** v. 123, n. 6, p. 593-601, 2002.

WINTERS, B. D.; BUSSEY, T. J. Transient Inactivation of Perirhinal Cortex Disrupts Encoding, Retrieval, and Consolidation of Object Recognition Memory. **The Journal of Neuroscience** v. 25, n. 1, p. 52-61, 2005.

WITKOVSKY, P. Dopamine and retinal function. **Documenta Ophthalmologica** v. 108, n. 1, p. 17-39, 2004.

WITTE, A. V. et al. Long-Chain Omega-3 Fatty Acids Improve Brain Function and Structure in Older Adults. **Cerebral Cortex**, 2013.

WOLBERS, T.; HEGARTY, M. What determines our navigational abilities? **Trends in Cognitive Sciences** v. 14, n. 3, p. 138-146, 2010.

YE, Y.-B. et al. Soy germ isoflavones improve menopausal symptoms but have no effect on blood lipids in early postmenopausal Chinese women: a randomized placebo-controlled trial. **Menopause** v. 19, n. 7, p. 791-798, 2012.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. **Chemical Reviews** v. 111, n. 10, p. 5944-5972, 2011.

YOSHIDA, Y. et al. Simultaneous measurement of F2-isoprostane, hydroxyoctadecadienoic acid, hydroxyeicosatetraenoic acid, and hydroxycholesterols from physiological samples. **Analytical Biochemistry** v. 379, n. 1, p. 105-115, 2008.

YOUDIM, K. A.; JOSEPH, J. A. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. **Free Radical Biology and Medicine** v. 30, n. 6, p. 583-594, 2001.

YUAN-DI, X. et al. Soy Isoflavone Alleviates A β 1-42-Induced Impairment of Learning and Memory Ability Through the Regulation of RAGE/LRP-1 in Neuronal and Vascular Tissue. **Current Neurovascular Research** v. 10, n. 2, p. 144-156, 2013.

YUAN, J.-P.; WANG, J.-H.; LIU, X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora – implications for health. **Molecular Nutrition & Food Research** v. 51, n. 7, p. 765-781, 2007.

YURKO-MAURO, K. et al. Results of the MIDAS trial: Effects of docosahexaenoic acid on physiological and safety parameters in age-related cognitive decline. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association** v. 5, n. 4, p. P84, 2009.

ZAHR, N. M. et al. Low Striatal Glutamate Levels Underlie Cognitive Decline in the Elderly: Evidence from In Vivo Molecular Spectroscopy. **Cerebral Cortex** v. 18, n. 10, p. 2241-2250, 2008.

ZAHR, N. M. et al. In Vivo Glutamate Measured with MR Spectroscopy: Behavioral Correlates in Aging. **Neurobiology of aging** v. 34, n. 4, p. 1265-1276, 2013.

ZARRINDAST, M.-R. et al. Involvement of opioidergic system of the ventral hippocampus, the nucleus accumbens or the central amygdala in anxiety-related behavior. **Life Sciences** v. 82, n. 23–24, p. 1175-1181, 2008.

ZARRINDAST, M.-R. et al. Influence of nitric oxide agents in the rat amygdala on anxiogenic-like effect induced by histamine. **Neuroscience Letters** v. 489, n. 1, p. 38-42, 2011.

ZARRINDAST, M. R. et al. Activation of dopamine D1 receptors in the medial septum improves scopolamine-induced amnesia in the dorsal hippocampus. **Behavioural Brain Research** v. 229, n. 1, p. 68-73, 2012.

ZARRINDAST, M. R.; KHAKPAI, F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. **Archives of Iranian Medicine** v. 18, p. 591-603, 2015.

ZEAMER, A.; BACHEVALIER, J. Long-term effects of neonatal hippocampal lesions on novelty preference in monkeys. **Hippocampus** v. 23, n. 9, p. 745-750, 2013.

ZENG, S. et al. Effect of daidzein on anxiety, social behavior and spatial learning in male Balb/cJ mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 96, n. 1, p. 16-23, 2010.

ZHAN, S.; HO, S. C. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 81, n. 2, p. 397-408, 2005.

ZHANG, X. Cholinergic Activity and Amyloid Precursor Protein Processing in Aging and Alzheimer's Disease. **Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders** v. 3, n. 2, p. 137-152, 2004.

ZHANG, Y.-B. et al. Soy isoflavone supplementation could reduce body weight and improve glucose metabolism in non-Asian postmenopausal women - A meta-analysis. **Nutrition** v. 29, n. 1, p. 8-14, 2013.

ZHANG, Y. B. et al. Soy isoflavone and its effect to regulate hypothalamus and peripheral orexigenic gene expression in ovariectomized rats fed on a high-fat diet. **Biomedical and Environmental Sciences** v. 23, n. 1, p. 68-75, 2010.

ZHAO, L.; CHEN, Q.; BRINTON, R. D. Neuroprotective and Neurotrophic Efficacy of Phytoestrogens in Cultured Hippocampal Neurons. **Experimental Biology and Medicine** v. 227, n. 7, p. 509-519, 2002.

ZHU, D. et al. Isoflavone Contents in Germinated Soybean Seeds. **Plant Foods for Human Nutrition** v. 60, n. 3, p. 147-151, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p.577- 614.

ANEXOS

ANEXO 1

Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Avaliação dos efeitos da exposição prolongada às isoflavonas em ratas na senescência: aspectos comportamentais, bioquímicos e anatomopatológicos”, protocolado sob o nº 3047/2013, utilizando 140 (cento e quarenta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, foi aprovado em reunião de 26/6/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Effects of prolonged exposure to isoflavones in rats senescence: behavioral, biochemical and histopatological”, protocol number 3047/2013, utilizing 140 (hundred forty) rats, under the responsibility Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa, was approved in the meeting of day 6/26/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 27 de junho de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

ANEXO 2

Laudo de análise do controle de qualidade do extrato seco de isoflavona 40%

Vigilância Sanitária CEVS 353870901-519-000001-1-6 M.S. 1.05.983-7 EMPRESA BRASILEIRA DE RADIAÇÕES LTDA	CONTROLE DE QUALIDADE Laudo de Análise Flores e ervas Com. Farm. Ltda - Estrada Vicente Belini, 175 - Piracicaba - SP CNPJ: 00.602.210/0001-50 E-mail: florien@florien.com.br Website: www.florien.com.br Fone: (19) 3429-1199	Farmacêutica Responsável: Dra. Paula Mariana Pezzatti CRF-SP 35044			
INFORMAÇÕES GERAIS					
Nosso Lote : 051671 Nomenclatura : ISOFLAVONA 40% Nome científico : Isoflavona Origem : China	Parte utilizada : Fruto Esterilização : Não houve Manufatura : 10/2013 Lote de origem : 20131011	Validade/ fornecedor : 10/2016 Validade/ nosso lote : 10/2016 Método de secagem : Spray Dryer			
ASPECTOS MACRO E MICROSCÓPICOS					
Pó fino e higroscópico de aspecto homogêneo. Não é realizado análise microscópica por não ser possível a visualização das estruturas histológicas que caracterizam a espécie.					
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS					
Cor : Bege	Odo : Característico	Sabor : Característico			
CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS					
Aspecto	Especificação	Resultado	pH	Especificação	Resultado
Elementos estranhos	Pó fino	De acordo	Solubilidade	De 3,5 a 7	5,63 [1:10] insolúvel em água
Umidade	Ausente	De acordo	Densidade	De 0,25 a 0,65 g/ml	*0,439 g/mL
Cinzas totais	De 1 a 11 %	2,7%	Líquido extrator	: NA	NA
Cinzas insolúveis	De 1 a 7 %	4,62%	Teor alcoólico	: NA	NA
Metais pesados	De 0,01 a 2,5 %	0,13%	Resíduo seco	: NA	NA
	NA	NA			
TESTES DE IDENTIFICAÇÃO					
Positivo para Isoflavona	4	1-Identificação por colorimetria 2-Espectometria na região ultravioleta-visível 3-Cromatografia por camada delgada 4-Outros			
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS					
Análise	Especificação	Resultado			
Contagem padrão em placas	Máx. 10.000 ufc/g	De acordo			
Bolores e leveduras	Máx. 100 ufc/g	De acordo			
Contagem de enterobactérias	Máx. 100 ufc/g ou ml	De acordo			
<i>Escherichia coli</i> (coliformes)	Máx. 100 ufc/g ou ml	De acordo			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	De acordo			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	De acordo			
<i>Salmonella sp</i>	Ausência	De acordo			
TEOR DE PRINCÍPIO ATIVO					
Especificação	Resultado	Método utilizado			
**Teor de Isoflavona:	41,21%	1-Identificação por colorimetria 2-Espectometria na região ultravioleta-visível 3-Cromatografia por camada delgada 4-Outros			
CONCLUSÃO DA ANÁLISE					
Aprovado					
DATA DA ANÁLISE					
24/02/2014					
DATA DA IMPRESSÃO					
OBS : *Sem compactação. **Dados transcritos do laudo do fornecedor.					
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS					
Farmacopéia Brasileira, 5ª ed.					
• AS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PRESENTES NESTE LAUDO ATENDEM AOS LIMITES ESTABELECIDOS PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE E SUA VALIDADE SERÁ DESCONSIDERADA CASO O PRODUTO SEJA MANIPULADO OU ARMAZENADO EM LOCAIS INADEQUADOS. • "NA" CORRESPONDE A TESTE NÃO APLICÁVEL. • A ALTERAÇÃO DE COR PODERÁ OCORRER POR SE TRATAR DE PRODUTO NATURAL.					

ANEXO 3

Ficha do aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7080094/2 - Thaís Meira Sandini

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5784-3/2	Tópicos Avançados em Toxicologia II	05/03/2013	17/06/2013	15	1	100	A	N	Concluída
VPT5770-2/2	Avaliação Toxicológica: Análises de Risco (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	08/04/2013	21/04/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Estratégias Farmacêuticas de Prevenção do Dano Cutâneo Induzido por Radiação Solar: Antioxidantes Naturais	03/06/2013	30/06/2013	60	0	0	-	N	Turma cancelada
FBC5752-2/4	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	05/06/2013	09/07/2013	45	3	75	A	N	Concluída
NEC5755-1/3	Fundamentos de Neuropsicologia Experimental (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	15/08/2013	23/10/2013	120	8	80	A	N	Concluída
QBQ5747-6/5	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	26/08/2013	02/09/2013	15	1	75	B	N	Concluída
FBA5728-3/8	Aprimoramento Didático	15/10/2013	11/11/2013	60	4	100	A	N	Concluída
MPS5757-3/3	Doença de Alzheimer e Transtornos Cognitivos: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Neuroquímicos e de Neuroimagem (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	07/03/2014	17/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
VPT5771-2/3	Preparação Pedagógica: A Comunicação no Processo de Ensino-Aprendizagem (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	05/05/2014	18/05/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5818-1/2	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	29/09/2014	02/11/2014	45	3	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	32
Estágios:			
Total:	10	20	32

Créditos Atribuídos à Tese: 167