

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

JOICE REGINA MARCILIO GABRIEL

**ENVOLVIMENTO DA NEUROINFLAMAÇÃO NO EFEITO DA
VITAMINA D E DONEPEZILA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS
ADULTAS E ENVELHECIDAS**

CRICIÚMA

2022

JOICE REGINA MARCILIO GABRIEL

**ENVOLVIMENTO DA NEUROINFLAMAÇÃO NO EFEITO DA
VITAMINA D E DONEPEZILA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS
ADULTAS E ENVELHECIDAS**

Dissertação de Mestrado apresenta ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Josiane Budni.

CRICIÚMA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

G118e Gabriel, Joice Regina Marcilio.

Envolvimento da neuroinflamação no efeito da vitamina D e Donepezila em ratas ovariectomizadas adultas e envelhecidas / Joice Regina Marcilio Gabriel. - 2022.

55 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Orientação: Josiane Budni.

1. Ovariectomia. 2. Envelhecimento. 3. Inflamação. 4. Vitamina D - Efeito fisiológico. 5. Donepezila - Efeito fisiológico. I. Título.

CDD. 22. ed. 618.11

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

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

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Silvia. Minha maior inspiração e grande apoiadora dos meus sonhos. Que dá o suporte diário para que eu possa seguir em frente e ir em busca dos meus sonhos, independentemente de quais sejam. A ti, mãe, todo meu amor infinito. Agradeço, também, a minha família, que me apoia e auxilia sempre. Meu sentimento por vocês é único.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, em especial a professora e minha orientadora Dra Josiane Budni, pelo exemplo, dedicação e atenção despendida a mim durante o processo da dissertação. Você sempre fará parte da minha trajetória acadêmica. Gratidão por todo conhecimento compartilhado e pelo acolhimento atendido. Você é inspiração e referência não somente como professora mas também como mãe e mulher. Sinto muito orgulho de você.

Agradeço também aos meus colegas do Laboratório de Neurologia Experimental, em especial à doutoranda Eduarda Behenck por se dedicar durante esses anos na pesquisa, juntamente com à mestrandia Gabriela Keller. A realização deste trabalho tornou-se mais fácil com o empenho e atenção de vocês.

Aos meus amigos, que passaram por mim durante essa jornada e fazem parte da minha vida e dessa conquista. Levarei vocês para sempre em meu coração. Gratidão pelas palavras de conforto quando precisei. Meu carinho e amor infinito.

À Deus por escrever minha história de uma forma que jamais imaginaria. Obrigada por todos os obstáculos e pessoas colocadas em meu caminho.

Finalmente, agradeço a todos que de certa forma auxiliaram, direta ou indiretamente, durante a minha caminhada no mestrado.

RESUMO

O envelhecimento é um processo natural, irreversível que pode ser bem-sucedido ou patológico, trazendo como consequência doenças crônicas degenerativas como a doença do Alzheimer a qual seu tratamento é a utilização do fármaco donepezila. A menopausa é caracterizada por baixos níveis de estrogênio. Pesquisas revelam que a falta desse hormônio pode estar relacionada com demências e que a vitamina D, quando suplementada, tem efeito neuroprotetor e neuromodulador. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar o envolvimento da neuroinflamação em ratas ovariectomizadas adultas e envelhecidas tratadas com vitamina D3 isolada ou associada com donepezila. Assim, foram utilizadas ratas Wistar com 60 ou 120 dias de idade que foram submetidas à ovariectomia (OVX) durante um ou oito meses. Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais: (1 - Sham + água; 2 - OVX + água; 3 - OVX+ Vitamina D 42 UI/kg; 4 - OVX+ Vitamina D 420 UI/kg; 5 - OVX+ Donepezila 1mg/kg; 6 - OVX+ Vitamina D 420 UI/kg + Donepezila 1mg/kg; 7 - OVX+ Vitamina D 420 UI/kg + Donepezila 1 mg/kg). O tratamento com vitamina D (42 ou 420 UI/kg por via oral) e/ou donepezila (1 mg/kg por via oral) teve a duração de 21 dias. No 22º dia do protocolo, 24 horas depois da última administração, os animais foram eutanasiados e foram dissecadas as estruturas: córtex frontal e hipocampo para análise dos níveis de citocinas como a interleucina 10 (IL-10), IL-1 β e fator de necrose tumoral α (TNF- α) por imunoensaio enzimático. Os resultados mostraram que ratas com 60 dias de vida e submetidas a OVX durante 1 mês apresentaram aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α , tanto no córtex frontal, quanto no hipocampo, e houve uma reversão quando tratadas com vitamina D 420 UI/kg e as associações. As ratas com 60 dias e submetidas a OVX durante 8 meses também apresentaram aumento dos níveis de IL-1 β no córtex frontal e hipocampo. Todos os tratamentos foram capazes de reverter este efeito, exceto a vitamina D 420 UI/kg no hipocampo destes animais. Neste protocolo, os níveis de TNF- α não apresentaram nenhuma alteração significativa. Contudo, houve um aumento nos níveis de IL-10 somente no córtex frontal, que foi revertido pelo tratamento com vitamina D 420 UI/kg, vitamina D 42 UI/kg e vitamina D 42 UI/kg + Donepezila. Já as ratas com 120 dias e submetidas a OVX durante um mês apresentaram aumento nos níveis de IL-1 β somente no córtex frontal, mas com o tratamento de vitamina D 420 UI/kg foi possível reverter este efeito. Conclui-se que a OVX induziu neuroinflamação e o tratamento destes animais com vitamina D isolada ou associada ao donepezila tiveram efeitos benéficos nas ratas, reduzindo a neuroinflamação, quando jovens e tratadas na fase inicial e tardia.

Palavras chave: Ovariectomia; Envelhecimento; Inflamação; Vitamina D; Donepezila.

ABSTRACT

Aging is a natural, irreversible process that can be successful or pathological, resulting in chronic degenerative diseases such as Alzheimer's disease. The menopause is characterized by low levels of estrogen. Research reveals that the lack of these hormones may be related to dementia and that vitamin D, when supplemented, has a neuroprotective and neuromodulatory effect. Therefore, the aim of this study is to evaluate the involvement of neuroinflammation in adult and aged ovariectomized rats treated with vitamin D3 alone or associated with donepezil. 60-day or 120-day-old Wistar rats that underwent ovariectomy (OVX) for 1 or 8 months were used. The animals were divided into 7 experimental groups (1 - Sham + water; 2 - OVX + water; 3 - OVX+ Vitamin D 42 IU/kg; 4 - OVX+ Vitamin D 420 IU/kg; 5 - OVX+ Donepezil 1mg/kg; 6 - OVX+ Vitamin D 420 IU/kg + Donepezil 1mg/kg; 7 - OVX+ Vitamin D 420 IU/kg + Donepezil 1mg/kg). Treatment with vitamin D (42 or 420 IU/kg orally) and/or donepezil (1 mg/kg orally) lasted 21 days. On the 22 day of the protocol, 24 hours after the last administration, the animals were euthanized and dissected as structures of the frontal cortex and hippocampus to analyze the levels of cytokines such as interleukin 10 (IL-10), IL-1 β and tumor necrosis factor α (TNF- α) by enzyme immunoassay. The results show that during 60 days of life and increase in β the results showed an OVX- α , both in the month of IL- α levels, in the frontal cortex, and in the hippocampus, and there was a reversal when treated with Vitamin D 420 IU /Kg and associations. The rats with 60 days and months also OVX for 8 months showed IL-1 β levels in the frontal cortex and hippocampus. All treatments were not able to reverse this effect, except a vitamin D 420 IU/kg of these animals. In this protocol, TNF- α levels did not show any significant change. However, there was an increase in IL-10 levels only in the frontal cortex, which was reversed by treatment with vitamin D 420 IU/kg, vitamin D 42 IU/kg and vitamin D 42 IU/kg + Donepezil. On the other hand, rats aged 120 days and submitted to OVX for 1 month showed an increase in IL-1 β levels only in the frontal cortex, but with the treatment of vitamin D 420UI/Kg it was possible to reverse this effect. It is concluded that the animals that underwent OVX induced neuroinflammation and the treatment of these animals with vitamin D alone or associated with donepezil had beneficial effects, reducing neuroinflammation, especially when young and treated in the early and late stages.

Keywords: Ovariectomy; Aging; Inflammation; D vitamin; Donepezil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Os estágios do workshop STRAW de envelhecimento reprodutivo adaptados de Soules et al., 2001..	12
Figura 2. Metabolismo da Vitamina.	17
Figura 3: Esquema de linha do tempo dos procedimentos cirúrgicos e do tratamento.	22
Figura 4: Esquema de linha do tempo dos procedimentos cirúrgicos e do tratamento.	23
Figura 5: Esquema de linha do tempo dos procedimentos cirúrgicos e do tratamento.	24
Figura 6: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de IL-1 β no córtex frontal (A) e hipocampo (B)..	26
Figura 7: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de TNF- α no córtex frontal (A) e hipocampo (B).	27
Figura 8: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B).	28
Figura 9: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 8 meses nos níveis de IL-1 β no córtex frontal (A) e hipocampo (B).	29
Figura 10: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 8 meses nos níveis de TNF- α no córtex frontal (A) e hipocampo (B).	30
Figura 11: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 8 meses nos níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B).	31
Figura 12: Ratas com 120 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de IL-1 β no córtex frontal (A) e hipocampo (B)..	32
Figura 13: Ratas com 120 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de TNF- α no córtex frontal (A) e hipocampo (B)..	33
Figura 14: Ratas com 120 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B)..	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA - Doença do Alzheimer;

DBP - Proteína de transporte

E2 - Estrogênio;

IACHÉ - Inibidores de acetilcolinesterase;

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

IL-10 - Interleucina 10;

IL-4 - Interleucina 4;

IL-6 - Interleucina 6;

L-1 β - Interleucina 1 β ;

OMS - Organização Mundial de Saúde;

OVX – Ovariectomia;

STRAM - Oficina de Estágios do Envelhecimento Reprodutivo;

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α ;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 ENVELHECIMENTO	10
1.2 MENOPAUSA	11
1.3 INFLAMAÇÃO NO ENVELHECIMENTO	13
1.4 DONEPEZILA	15
1.5 VITAMINA D	16
1.6 JUSTIFICATIVA	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 METODOLOGIA	20
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	20
3.2 CIRURGIA PARA OVX OU <i>SHAM</i>	20
3.3 TRATAMENTO CRÔNICO	21
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL	21
3.4.1 Protocolo 1	21
3.4.3 Protocolo 2	22
3.4.4 Protocolo 3	23
3.5 COLETA DAS AMOSTRAS	24
3.6 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO	25
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento envolve um processo em que o tecido ou o organismo sofre um declínio nas funções fisiológicas, incluindo mudanças na composição corporal, desequilíbrio na produção e utilização de energia, desregulação homeostática, neurodegeneração e perda de neuroplasticidade (Bektas, 2017). Sabe-se que esse processo está relacionado com fatores fisiológicos, estilo de vida, gênero, cultura, educação, condição socioeconômica e também com variantes genéticas que expressam genes de acordo com sequenciamento do genoma e fenótipos individuais (Barbon, 2016; Xia e Han 2018).

A partir da meia-idade, os danos moleculares tendem a aumentar, caracterizando o envelhecimento como propriedades ou mecanismos distintos, por exemplo: quando se refere a um indivíduo sadio, ocorre um processo biológico cumulativo que ao passar dos anos, sofre modificações preocupantes nos aspectos morfológico, bioquímico, funcional e psicológicos, trazendo patologias que são independentes ao estilo de vida de cada pessoa (Caetano, 2006; Gems, 2014; Zhang et al., 2020). Tais modificações tendem, mais frequentemente, levar a doenças neurodegenerativas, principalmente, quando associadas a idade, como a doença de Alzheimer (DA), cuja principal sintoma é a alteração da neurocognição (Sereniki e Vital, 2008; Duan et al., 2020).

A DA afeta 50% das pessoas com idade de 85 anos e 5% a 10% com idade próxima de 65 anos. Segundo o relatório mundial da DA (2019), existem mais de 35,6 milhões de pessoas vivendo com essa patologia no mundo. Entretanto, esse número pode triplicar até 2050, sendo que o custo atual para o tratamento de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é estimado em 818 bilhões de dólares, e esses valores tendem a aumentar conforme o aumento do envelhecimento da população (Alzheimer's Association, 2021). Outros exemplos de doenças neurodegenerativas além da DA, são as doenças vasculares, demência frontotemporal e esclerose múltipla (Hamdan e Ramos, 2016).

Com a progressão do envelhecimento na população, a estatística entre os anos de 2015-2020 na América Latina e Caribe, obteve um aumento de 3,77%. Em países que estão em desenvolvimento está aumentando rapidamente o

envelhecimento, principalmente no Brasil (UNFPA, 2020). Segundo Almeida (2003), as mulheres irão constituir a maioria da população e irão viver mais que os homens. Diante disso, milhões de mulheres passarão cerca de um terço de suas vidas após o diagnóstico da menopausa (Almeida, 2003; Lobo et al, 2014; De Abrantes, 2019).

1.2 MENOPAUSA

A transição da menopausa é um processo fisiológico complexo acompanhado pelos efeitos do envelhecimento. É um evento que geralmente acomete mulheres entre os 40-58 anos. Quando atinge idades inferiores a 40 anos é considerada menopausa prematura ou precoce. Alguns fatores etiológicos podem estar relacionados com a menopausa prematura, tais como o tabagismo, uso anterior de anticoncepcionais orais, índice de massa corporal, origem étnica e história familiar. Além disso, pode surgir de causas naturais, sendo diagnosticada após 12 meses de amenorreia quando não associada com uma patologia ou também, pode ser induzida por meio quimioterapia, radiação ou de cirurgia, através da ovariectomia (OVX) (Pines, 2016; Sibert et al, 2017). Quando é induzida por OVX pode haver aumento do desenvolvimento de demência ou prejuízo cognitivo. Quanto mais jovem a mulher, maiores os riscos de desenvolver hiperplasia e câncer endometrial tais como carcinoma seroso, carcinoma seroso-papilar, carcinoma de células claras e carcinosarcoma, indicando a importância do efeito neuroprotetor do estrogênio (Nelson, 2008; Rocca et al., 2011; Tempfer et al., 2020). Por outro lado, o estrogênio e a exposição ao longo prazo podem aumentar o risco de adenocarcinoma endometriode (Nelson, 2008; Rocca et al., 2011; Bińkowska e Woron, 2015; Duan et al., 2020; Ma et al., 2020; Tempfer et al., 2020).

Quando o ciclo se torna irregular, é devido a redução das concentrações de hormônios ovarianos (estrogênio e progesterona), enquanto as concentrações de hormônio folículo-estimulante (FSH) tendem a aumentar. Conforme for avançando a transição da menopausa, os ciclos menstruais são perdidos até que em um determinado momento, a ovulação para definitivamente (Nelson, 2008; Ma et al., 2020). Um modelo desenvolvido na Oficina de Estágios do Envelhecimento Reprodutivo (STRAM) descreveu os eventos do processo da menopausa consistindo em sete etapas: -5, -4, -3, -2, -1, 0, +1, +2. As etapas -5 a -3 retratam os anos reprodutivos, as etapas -2 a -1 retratam a transição da menopausa, e, por fim, as

etapas +1 e +2 representam a pós menopausa precoce e tardia (Figura 1). A troca de um estágio para outro acontece em um curto espaço de tempo antes do período menstrual final, e isso é devido às características baseadas no ciclo menstrual (Hansen et al., 2012).

								Período final da menstruação (FMP)		
ETAPAS	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2			
Estágios	Reprodutiva			Transição da menopausa		Pós-menopausa				
	Inicial	Pico	Tarde	Inicial	Tarde*	Inicial*	Tarde			
				Perimenopausa						
Duração dos estágios	Variável			Variável		1 ano	4 anos	Até a morte		
Ciclo menstrual	Irregular	Regular		Transição da menopausa com diferença de 7 dias	Transição da menopausa tardia com diferença de ≥ 2 ciclos	12 meses sem ciclo	Nenhum ciclo			
Dosagem hormonal	Normal FSH		↑ FSH	↑ FSH		↑ FSH				

Figura 1. Os estágios do workshop STRAW de envelhecimento reprodutivo adaptados de Soules et al., 2001. Os estágios -5 à -3 abrangem o intervalo reprodutivo, em que o começo da menarca está no estágio -5 levando anos para a regulação dos ciclos (período menstrual a cada 21 a 35 dias). Nos estágios -2 (inicial) representam a transição da menopausa precoce, em que os ciclos obtêm amenorreia entre sete dias ou mais (período menstrual a cada 24 dias). O estágio -1 (tardia), simboliza a transição da menopausa final, é caracterizado por dois ou mais ciclos menstruais omitidos entre um intervalo de 60 dias ou mais. No estágio 0 é caracterizado pelo período final da menopausa (FMP), partindo para após-menopausa. Os estágios +1 (inicial) são definidos com cinco anos desde o FMP, dividida em segmento A: um ano após o FMP, e segmento B: nos próximos quatro anos após o FMP. O último estágio +2 (tardia) início definido, mas sua duração varia, pois termina com o falecimento da mulher. Na fase reprodutiva (-3) o aumento do FSH é sutil contudo os níveis de FSH aumentam gradualmente ao longo da transição da menopausa mas não sendo possível identificar os níveis de corte para os estágios -3 a +1 devido a variação deles (Fonte: Hansen et al., 2012).

A recomendação clínica para mulheres que por alguma razão entraram na menopausa, é a reposição hormonal. Os estudos relatam que o estrogênio tem efeitos neuroprotetores benéficos (Morgan et al., 2018; Ma et al., 2020; Yang et al., 2020), cumprem efeitos de fatores neurotróficos, proteção contra o estresse oxidativo, contra a hipoglicemia e contra o dano causado pela proteína amilóide. Os

estrogênios podem estimular a formação de fatores de crescimento neural, aumentar a concentração de receptores dos neurotransmissores (serotonina, dopamina e norepinefrina) e evidentemente exercer importante ação anti-inflamatória (Lobo et al., 2014; Dolitsky et al., 2020). Contudo, grandes ensaios clínicos como *Women's Health Initiative* (WHI) (Morgan et al., 2018) mostraram riscos cognitivos associados ao tratamento com o estrogênio. Este hormônio é derivado do colesterol, e uma das suas funções é a regulação dos processos reprodutivos podendo apresentar relação com a cognição, sendo assim sua deficiência pode causar o déficit de memória e aprendizado (Hansberg-Pastor et al., 2015; Siebert et al., 2017). Resultados revelaram que a idade e o estágio da terapia hormonal podem ser os principais fatores para os efeitos benéficos ou prejudiciais do tratamento com estrogênio, o que é chamado por alguns autores como "hipótese do tempo" ou "hipótese da janela de oportunidade", essa hipótese é representada como uma modificação de efeito (Rocca et al., 2011). O estudo *Women's Health Initiative Memory Study* (WHIMS) indicou risco de demência em mulheres que fizeram a reposição hormonal devido a diminuição de volumes do hipocampo e córtex frontal, além de serem observadas lesões na substância branca do cérebro, sugerindo que o tratamento pode apresentar problemas na cognição, uma vez que essas regiões são responsáveis no papel de memória e aprendizado (Morgan et al., 2018; Reid et al., 2021). Outros estudos observaram que em mulheres mais jovens quando induzida a menopausa por cirurgia pode-se relacionar a diminuição do risco de desenvolvimento da DA (Lobo et al., 2014; Pines., 2016).

Devido a essa ambiguidade dos efeitos do estrogênio, acredita-se que a reposição hormonal deve ser realizada logo após a menopausa, podendo servir como prevenção de doenças cardiovasculares e doenças crônicas (Paciuc, 2020). Contudo, outras substâncias ou fármacos podem ajudar na prevenção do declínio cognitivo.

1.3 INFLAMAÇÃO NO ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é impulsionado por mecanismos inter-relacionados que acarretam o surgimento de fenótipos específicos. Os idosos tendem a ter um estado pró-inflamatório leve ou de baixo grau e seus mecanismos específicos que

correlacionam as doenças crônicas, permanecem obscuros. Tais desregulações são encontradas em todos os organismos vivos, mas não são bem compreendidas. A inflamação de fato, faz parte do processo de defesa do organismo, ela é transitória, o que significa que quando necessário ela aumenta ou diminui sem consequência a longo prazo, mas quando a inflamação é persistente tornando-se crônica, manifesta-se juntamente a outras patologias (Bektas et al., 2018; Bachmann et al., 2020). Nestas doenças relacionadas à neuroinflamação, ocorre a ativação do sistema imune inato cerebral, sendo um mecanismo de defesa que tem a intenção de proteger o sistema nervoso central (SNC) contra agressões e lesões infecciosas (Glass et al., 2010; Bachmann et al., 2020). A DA é a principal doença neuroinflamatória e neurodegenerativa que ativa não somente a resposta imune inata como também a adaptativa, além de induzir mecanismo para compensação, reparo e remodelação do tecido lesionado (Lo, 2010; Fulop et al., 2020; Minhas et al., 2020). Após a lesão neural e ativação das células microgлияis, os astrócitos reativos também ajudam na neuroinflamação, uma vez que sua função é neuroprotetora e neuromoduladora, contribuindo para a modulação sináptica (Liddelow, 2017).

Do ponto de vista clínico, o envelhecimento pode apresentar biomarcadores inflamatórios específicos incluindo a interleucina-6 (IL-6), IL-1 β , IL-18 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Bektas et al., 2017). A inflamação corresponde principalmente a um aumento das interleucinas IL1 β , interferons (IFNs) e TNF α (Bachmann et al., 2020). Quanto mais constante a inflamação de baixo grau for, mais suscetível os idosos ficam a desenvolver outras doenças como por exemplo, diabetes. Porém, nem todos os idosos dispõem a essa susceptibilidade para a inflamação crônica e acabam neutralizando a inflamação por meio da expressão de moléculas anti-inflamatórias (Hagen, 2020). Os níveis elevados de IL-6 também podem estar associados a mudanças sistêmicas do envelhecimento (Soysal et al., 2016) e o TNF- α exacerbado está relacionado com infecções crônicas (Hagen, 2020).

A resposta inflamatória é distinta quando se compara com homem e mulher. As mulheres adultas possuem a capacidade de desenvolver respostas inatas e adaptativas mais resistentes quando comparado com o sexo masculino gerando uma inflamação mais eficaz. Elas potencializam o aumento da produção de células Th2, células T reguladoras, macrófagos M2, citocinas IL-4, IL-10. Já os homens

apresentam uma resposta imune que depende de linfócitos Th, alta produção de IL-33 e baixos níveis de mastócitos reativos. Contudo, eles também têm uma resposta aumentada da microglia no SNC e uma presença aumentada de TNF- α e prostaglandinas em resposta a estímulos inflamatórios (Villapol et al., 2019; Bachmann et al., 2020).

No envelhecimento, o sistema imunológico fica comprometido e é caracterizado pelo aumento aberrante da ativação da imunidade inata, além dos níveis elevados de mediadores inflamatórios circulantes e a diminuição da resposta imune adaptativa. Contudo, vários fatores ambientais podem modificar o estado inflamatório, devido a isso, é de extrema importância intervir e direcionar a inflamação para assim, promover um envelhecimento saudável (Fulop et al., 2018; Bachmann et al., 2020).

1.4 DONEPEZILA

No envelhecimento, o objetivo é ficar saudável e evitar doenças com a DA. Contudo, quando a doença está instalada, a única estratégia são os tratamentos paliativos, pois a DA não tem cura. Ou mesmo, uma alternativa é tentar prevenir o declínio cognitivo que precede a DA (Sengok, 2020). Entre os tratamentos existentes para a DA, encontram-se fármacos inibidores da acetilcolinesterase (IACHÉ): donepezila, rivastigmina e galantamina. Estes fármacos contribuem com a neurotransmissão colinérgica, inibindo a degradação da acetilcolina, o neurotransmissor associado à memória (Birks et al., 2008; Takada et al., 2008).

O donepezila, aprovado em 1997 e a partir disso, vem sendo utilizado em estágio leve a moderado de demência. Estudos mostraram que em doses de 5 e 10 mg comparado com placebo, ambas obtiveram benefícios em suas atividades da vida diária, mas não mostraram eficácia nos sintomas comportamentais. Para pacientes em estados mais graves, a dose maior mostrou um efeito superior na cognição. Entretanto, ainda é possível observar os efeitos colaterais desse medicamento (Spieler et al., 2020). A donepezila pode proteger os neurônios por estimular os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) contra neurotoxicidade induzida pelo glutamato indiretamente ou diretamente. Contudo, tanto a ação do donepezila e outros IACHÉ não está bem claro, uma vez que afeta a mielinização ou

as células precursoras de oligodendrócitos (Joe e Ringman, 2019; Spieler et al., 2020).

1.5 VITAMINA D

O nome coletivo da vitamina D3 é colecalciferol e da vitamina D2 é ergocalciferol, ambas têm um importante papel na regulação do metabolismo do cálcio e do fosfato regulados por *feedback*, envolvendo enzimas e receptores assemelhando-se aos precursores hormonais esteroides (Waterhouse et al., 2009; Kulda, 2012; Mokhtari et al., 2020; Saponaro et al., 2020).

Acredita-se que o principal efeito benéfico da suplementação da vitamina D seja associado com a cognição, devido a liberação do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica no cérebro, estimulando a síntese de neurotrofinas e aumentando o crescimento dos neurônios (Kaviani et al., 2020; Landel et al., 2016). Estudos mostram que a vitamina D pode atuar na neuroimunomodulação e neuroproteção (Mokhtari-Zaer et al., 2020). Diante disso, é aconselhável a introdução empírica para todos os idosos para fins de triagem de rotina (Annweiler et al., 2010; Kositsawat e Geraci, 2010; Anjum et al., 2018; Kaviani et al., 2020). Um estudo que incluiu indivíduos de 80 anos de idade demonstrou que aqueles que receberam suplementação oral de vitamina D3 (800 UI por dia ou 100.000 UI por mês) por um período de 16 meses, apresentaram melhora na cognição, nas habilidades executivas onde é responsável de controlar pensamentos, emoções e ações, em comparação com os grupos controles (Sultan et al., 2020).

A vitamina D pode ser absorvida através da pele mediante a exposição ao sol, ou seja, endogenamente e também por meio da ingestão de alimentos tais como os peixes gordurosos (salmão, cavala e atum) (Dominguez et al., 2021; López-Baena et al., 2020). Na figura 2 observa-se mais detalhadamente o metabolismo da vitamina D, em que a pré vitamina D passa por processos de isomerização quando é exposta na camada basal da pele ou absorção intestinal. Logo, chega na corrente sanguínea, interagindo com a proteína de transporte (DBP) e armazenada no tecido adiposo. Chegando no fígado é então metabolizada e as

vitaminas D2 e D3 são convertidas em 25-hidroxicolecalciferol ou calcidiol (forma inativa). No rim, a 25-hidroxicolecalciferol - (25 (OH) D) é hidrolisada pela 1 α -hidroxilase, produzindo sua forma ativa, o calcitriol (1,25 (OH) 2 D) (Hossein e Holick, 2013; Remelli et al., 2019; Saponaro et al., 2020; Sultan et al., 2020; Dominguez et al., 2021).

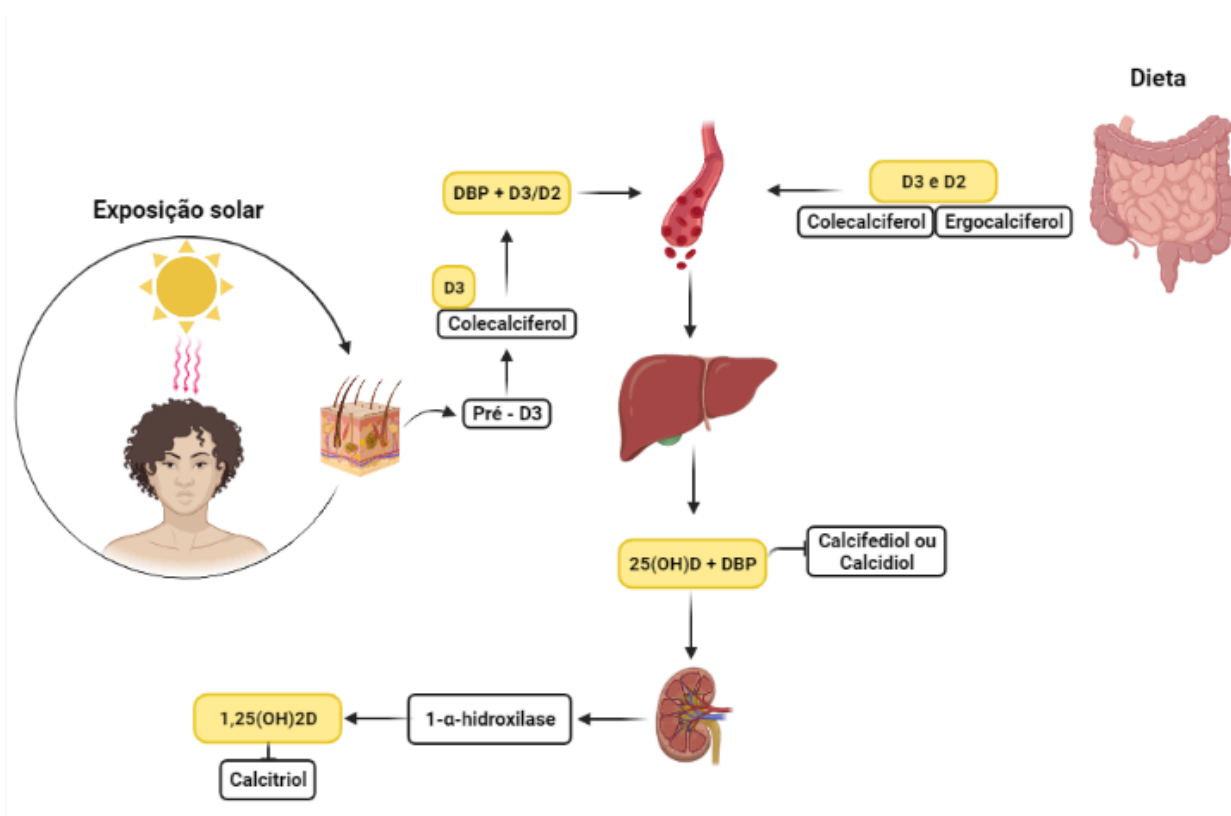


Figura 2. Metabolismo da Vitamina. Observa-se que com a exposição dos raios ultravioleta do sol (comprimento de ondas cerca de 190-320 nm e radiação ultravioleta B), a pré vitamina D3 é sintetizada a partir da 7-desidrocolesterol (pró-vitamina D). Esta pré vitamina D3 é isomerizada em vitamina D3 (colecalfiferol) ativa nas camadas basais da epiderme, obtida a partir da absorção intestinal de alimentos naturais ou suplementação da D2 (ergocalciferol). Quando chega na corrente sanguínea, o colecalfiferol interage fracamente com a proteína de ligação da vitamina D (DBP) para o transporte e é armazenada no tecido adiposo. É então metabolizada e transportada para o fígado e a D2 e D3 são hidroxiladas pela enzima 25-hidroxilase ou calcidiol, a forma biologicamente inativa. Novamente no rim, a 25-hidroxicolecalciferol - (25 (OH) D) é hidroxilada pela 1 α -hidroxilase produzindo de forma ativa - 1,25 (OH)₂ D (calcitriol), que tem efeitos diferentes agindo em tecidos-alvos. Existem vários mecanismos que regulam o metabolismo da vitamina D, como os níveis séricos de fosfato e cálcio, fatores de crescimento de fibroblasto e hormônio da paratireóide. Alguns hormônios que atuam na paratireóide, também exercem a função reguladora da síntese de calcitriol, como por exemplo o estrogênio.

Ainda não se tem um consenso sobre exposição solar segura e eficaz, mas um estudo mostrou que em pessoas que possuem teor elevado de melanina, 90% dos casos reduzem a síntese de vitamina D. Além disso, em 75% dos idosos a síntese cutânea também é prejudicada (Webb et al., 1989). Quinze minutos de

exposição ao sol do meio-dia equivale a 10.000UI (250 µg), mas fatores influenciam nessa dosagem tais como: idade, cor da pele (teor de melanina), estação, clima, roupas, área de superfície corporal exposta e uso de protetor solar (Dominguez et al., 2021). A caracterização do envelhecimento está relacionado com o hormônio paratireóide e da fosfatase alcalina, e a uma diminuição de cálcio e fósforo e calcitriol. A deficiência da vitamina D é um problema mundial que afeta principalmente os idosos. O estrogênio pode controlar a regulação da síntese na produção de secosteroide ativo, e como o sexo feminino durante sua segunda metade de vida estão no período da menopausa, a dosagem sérica dos hormônios ovarianos tende a cair (Landel et al., 2016; Sultan et al., 2020). A suplementação da vitamina D pode melhorar os níveis metabólicos em mulheres que entraram na menopausa mais jovens ou mais velhas. Além de sugerir que o uso contínuo da vitamina pode ter algumas vantagens no efeito cognitivo, como a melhora do aprendizado (Landel et al., 2016; Remelli et al., 2021; López-Baena et al., 2020).

1.6 JUSTIFICATIVA

Segundo dados da OMS, entre os anos 2015-2050 a população mundial de idosos acima de 60 anos, irá de 12% para 22%, sendo que 80% destes viverão em países de baixa renda. Uma pesquisa em 2016, mostrou que a expectativa de vida das mulheres era de 74 anos e a dos homens, 69 anos. No Brasil, a expectativa de vida ao nascer em 2019 segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) é de 80 anos para as mulheres e 73 anos para os homens (IBGE., 2020). Tendo em vista que o sexo feminino passará cerca de um terço de vida após ao diagnóstico da menopausa (Lobo et al., 2014); e que já há estudos que mostram os avanços significativos e os benefícios da vitamina D para diversos tratamentos, principalmente quando associados ao processo de envelhecimento ovariano em mulheres, que o processo inflamatório de baixo grau pode predispor a doenças neurodegenerativas como a DA. Torna-se fundamental investigar o efeito da vitamina D na menopausa e possíveis associações com fármacos clássicos utilizados em demências como a DA .

Assim, este estudo tem por objetivo avaliar o envolvimento da neuroinflamação em ratas ovariectomizadas adultas, envelhecidas e tratadas com vitamina D3 ou associação com donepezila.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da vitamina D isolada ou associada com donepezila na inflamação em ratas ovariectomizadas adultas e envelhecidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração de vitamina D isolada ou associada ao donepezila através sobre os níveis de IL-1 β , IL-10 e TNF- α em ratas com idade de 60 dias ovariectomizadas durante 1 mês, no córtex frontal e hipocampo;
- Avaliar o efeito da administração de vitamina D isolada ou associada ao donepezila através sobre os níveis de IL-1 β , IL-10 e TNF- α em ratas com idade de 60 dias ovariectomizadas durante 8 meses, no córtex frontal e hipocampo;
- Avaliar o efeito da administração de vitamina D isolada ou associada ao donepezila através sobre os níveis de IL-1 β , IL-10 e TNF- α em ratas com idade de 120 dias ovariectomizadas durante 1 mês, no córtex frontal e hipocampo.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Para o estudo foram utilizadas ratas Wistar fêmeas com 60 e 120 dias de idade procedentes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. As ratas ficaram abrigadas em 5 por caixa com acesso a alimento e água *ad libitum* e foram mantidas em um ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

Todos os procedimentos experimentais foram efetuados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA): Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA e Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da UNESC (123/2019 ADENDO) (ANEXO A).

3.2 CIRURGIA PARA OVX OU SHAM

As fêmeas foram anestesiadas com uma mistura de cetamina/xilazina (cetamina: 80 mg/kg e xilazina: 10 mg/kg intramuscular, i.m). Após a desinfecção da pele com clorexidina, uma incisão cutânea na linha média dorsal foi feita caudal na parte posterior das costelas. Usando dissecação sem corte ao túnel subcutâneo, lateral a incisão da pele, os músculos da parede abdominal posterior foram separados para expor a cavidade abdominal. O ovário foi localizado em uma almofada de gordura de um a dois centímetros abaixo dos músculos. A gordura periovariana foi presa com pinça para levantar e exteriorizar o ovário. A trompa de Falópio foi esmagada e o ovário foi removido por cauterização da área presa. A incisão da pele foi fechada usando fio de sutura número 6. Os animais controle ou *Sham* somente passaram pelo procedimento cirúrgico, sem a cauterização dos ovários. Após a OVX, as fêmeas ovariectomizadas foram colocadas em uma gaiola comunitária com acesso *ad libitum* aos alimentos e água (Brance et al., 2014). Foi adicionado 0,2 mg/mL de dipirona sódica na água das garrafas de beber dos animais, disponível *ad libitum* durante 72 horas, para minimizar a dor pós cirúrgica. Após a cirurgia e para garantir a ausência de hormônios ovarianos, as ratas foram

devolvidas às instalações habitacionais durante 1, 4 ou 8 meses. Após este período de tempo, as ratas foram distribuídas aleatoriamente para cada um dos grupos experimentais e submetidas a tratamento crônico com vitamina D3 sozinha ou associada ao donepezila.

3.3 TRATAMENTO CRÔNICO

Os animais foram tratados com vitamina D3 (Adera D3® – colicalciferol 3.300 UI/mL, Laboratório Mantecorp Farmasa) nas doses de 42 ou 420 UI/kg e donepezila (1 mg/kg) (Brance et al., 2014; Briones e Darwish, 2012) por via oral (v.o.) diluída em água e administrado por gavagem, durante 21 dias. As gavagens foram administradas todos os dias às 10:00 h, com auxílio de uma agulha de gavagem com o máximo cuidado para evitar o estresse dos animais. No 22º dia as ratas sofreram eutanásia e o sangue e as estruturas cerebrais: córtex frontal e hipocampo foram dissecadas para as análises dos níveis de citocinas.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

3.4.1 Protocolo 1

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas com 60 dias para mimetizar a menopausa precoce e tratamento precoce. Portanto, após 1 mês de OVX foram tratadas com vitamina D sozinha ou associada ao donepezila. Estas foram divididas em 7 grupos experimentais após 1 mês da OVX. As ratas foram tratadas com vitamina D3 na dose de 42 UI/kg, 420 UI/kg sozinha ou associada ao donepezila 1 mg/kg ou água via oral por gavagem durante 21 dias (Figura 3).

As ratas foram divididas em sete grupos experimentais:

1. 10 animais com idade de 3 meses *Sham* tratadas com água por gavagem (Grupo *Sham* + água);
2. 10 animais com idade de 3 meses OVX tratadas com água por gavagem (Grupo OVX + água);
3. 10 animais com idade de 3 meses OVX tratadas Vit D3 42 UI/kg por gavagem (Grupo OVX + Vit D3 42);

4. 10 animais com idade de 3 meses OVX tratadas Vit D3 420 UI/kg por gavagem (Grupo OVX + Vit D3 420);
5. 10 animais com idade de 3 meses OVX tratadas Donepezila 1 mg/kg por gavagem (Grupo OVX + Donepezila);
6. 10 animais com idade de 3 meses OVX tratadas Donepezila 1 mg/kg + Vit 42 UI/kg por gavagem (Donepezila + Vit 42);
7. 10 animais com idade de 3 meses OVX tratadas Donepezila 1 mg/kg + Vit 420 UI/kg por gavagem (Donepezila + Vit 420);

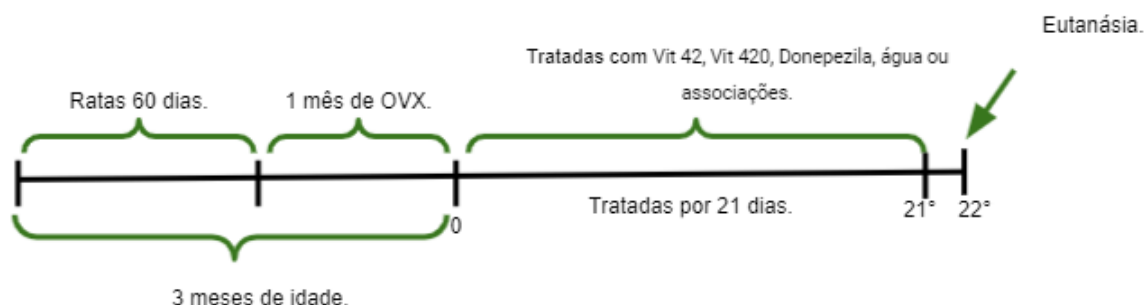


Figura 3: Esquema de linha do tempo dos procedimentos cirúrgicos e do tratamento.

3.4.3 Protocolo 2

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas com 60 dias para mimetizar a menopausa precoce e tratamento mais tardio. Portanto, após 8 meses de OVX foram tratadas com vitamina D sozinha ou associada ao donepezila. Estas foram divididas em 7 grupos experimentais após 8 meses da OVX. As ratas foram tratadas com vitamina D3 na dose de 42 UI/kg, 420 UI/kg sozinha ou associada ao donepezila ou água via oral por gavagem durante 21 dias (Figura 4).

As ratas foram divididas em sete grupos experimentais:

1. 10 animais com idade de 10 meses Sham tratadas com água por gavagem (Grupo *Sham* + água);
2. 10 animais com idade de 10 meses OVX tratadas com água por gavagem (Grupo OVX + água);

3. 10 animais com idade de 10 meses OVX tratadas Vit D3 42 UI/kg por gavagem (Grupo OVX + Vit D3 42);
4. 10 animais com idade de 10 meses OVX tratadas Vit D3 420 UI/kg por gavagem (Grupo OVX + Vit D3 420);
5. 10 animais com idade de 10 meses OVX tratadas Donepezila 10 mg/kg por gavagem (Grupo OVX + Donepezila);
6. 10 animais com idade de 10 meses OVX tratadas Donepezila 10 mg/kg + Vit 42 UI/kg por gavagem (Donepezila + Vit 42);
7. 10 animais com idade de 10 meses OVX tratadas Donepezila 10 mg/kg + Vit 420 UI/kg por gavagem (Donepezila + Vit 420);

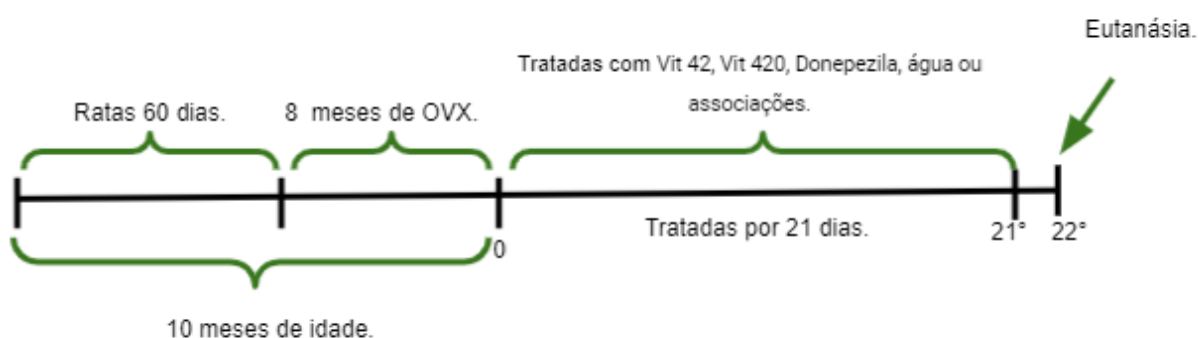


Figura 4: Esquema de linha do tempo dos procedimentos cirúrgicos e do tratamento.

3.4.4 Protocolo 3

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas com 120 dias para mimetizar a menopausa tardia e tratamento precoce. Portanto, após 1 mês de OVX foram tratadas com vitamina D sozinha ou associada ao donepezila. Estas foram divididas em 7 grupos experimentais após 1 mês da OVX. As ratas foram tratadas com vitamina D3 na dose de 42 UI/kg, 420 UI/kg sozinha ou associada ao donepezila 1 mg/kg ou água via oral por gavagem durante 21 dias (Figura 5).

As ratas foram divididas em sete grupos experimentais:

1. 10 animais com idade de 5 meses *Sham* tratadas com água por gavagem (Grupo *Sham* + água);
2. 10 animais com idade de 5 meses OVX tratadas com água por gavagem (Grupo OVX + água);

3. 10 animais com idade de 5 meses OVX tratadas Vit D3 42 UI/kg por gavagem (Grupo OVX + Vit D3 42);
4. 10 animais com idade de 5 meses OVX tratadas Vit D3 420 UI/kg por gavagem (Grupo OVX + Vit D3 420);
5. 10 animais com idade de 5 meses OVX tratadas Donepezila 1 mg/kg por gavagem (Grupo OVX + Donepezila);
6. 10 animais com idade de 5 meses OVX tratadas Donepezila 1 mg/kg + Vit 42 UI/kg por gavagem (Donepezila + Vit 42);
7. 10 animais com idade de 5 meses OVX tratadas Donepezila 1 mg/kg + Vit 420 UI/kg por gavagem (Donepezila + Vit 420);

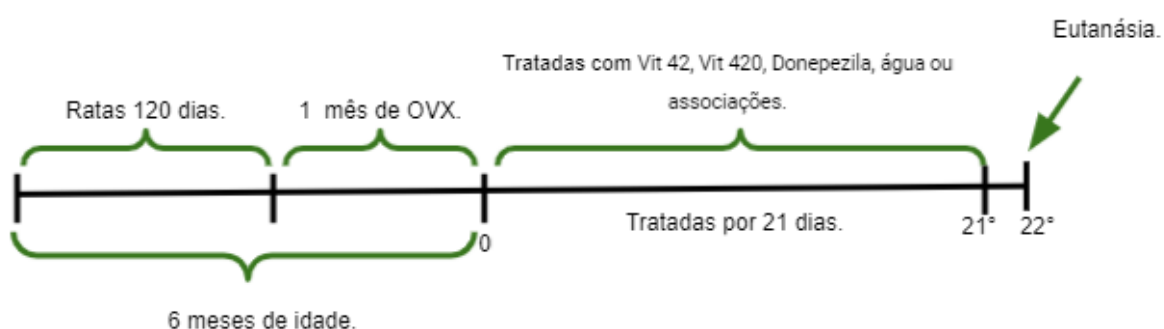


Figura 5: Esquema de linha do tempo dos procedimentos cirúrgicos e do tratamento.

Em todos os protocolos os animais sofreram eutanásia no 22° para a retirada de estruturas cerebrais como o hipocampo e córtex frontal para a análise dos níveis de citocinas.

3.5 COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais foram submetidos à eutanásia no 22° dia do experimento (1 dia após final do tratamento de 21 dias com a vitamina D e associações), por decapitação na guilhotina. Os animais ficaram aguardando a eutanásia na sala ao lado para evitar que sentissem o cheiro do sangue, e a guilhotina foi lavada em água corrente entre cada eutanásia. Foram coletados o córtex frontal e hipocampo para posteriores análises imunológicas para avaliar os níveis de citocinas.

3.6 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO

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

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., USA). O teste de normalidade Shapiro–Wilk foi realizado para confirmar se os dados possuem uma distribuição normal. Os dados de imunoenensaio enzimático, foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste post hoc de Duncan quando o $p < 0,05$. Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS

A figura 6A mostra os resultados dos níveis de IL-1 β no córtex das ratas com 60 dias de idade e submetidas a OVX durante 1 mês. É possível observar que em comparação com o grupo Sham os níveis de IL-1 β aumentaram significativamente no grupo OVX + ÁGUA. Os níveis de IL-1 β , no entanto diminuíram nas ratas ovariectomizadas tratadas com VIT D 420 UI/Kg, VIT D 42 UI/Kg + DONE e VIT D 420 UI/Kg + DONE quando comparado ao grupo OVX + água. Já a figura 6B mostra os resultados dos níveis de IL-1 β no hipocampo desses animais e quando comparados ao grupo SHAM houve um significativo no grupo OVX + ÁGUA, OVX + VIT D 42 UI/Kg e OVX + DONE.

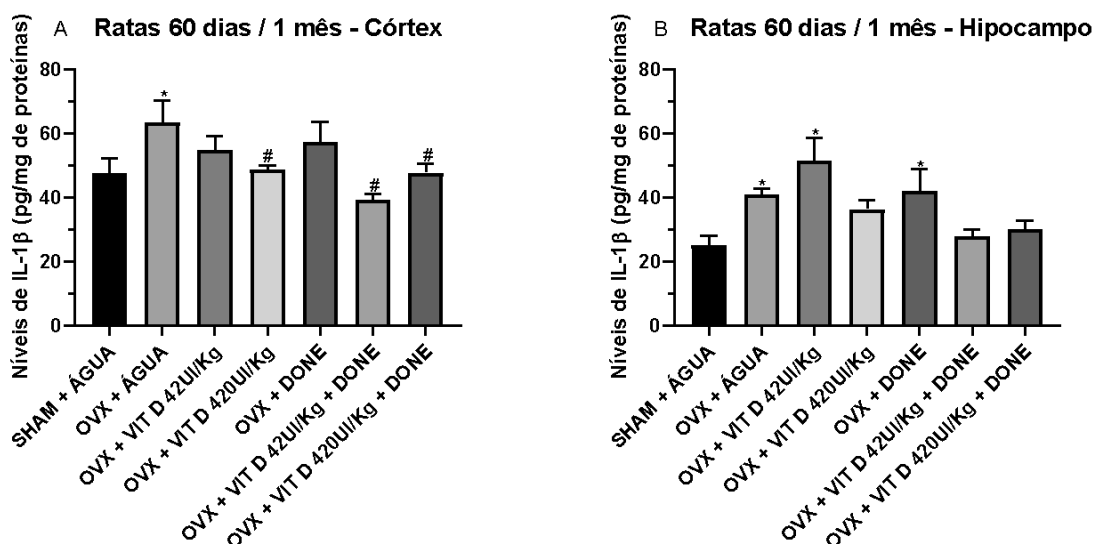


Figura 6: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de IL-1 β no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 3-6. *p<0,05 quando comparado com o grupo controle e #p<0,05 quando comparado com o grupo controle OVX. Abreviaturas: OVX (ovariectomia); Vit (vitamina); Done (donepezila).

Os níveis de TNF- α no córtex das ratas com idade de 60 dias e submetidas a OVX durante 1 mês possibilitou observar os mesmos resultados que nos níveis de IL-1 β da mesma estrutura. Houve um aumento de TNF- α quando comparado o grupo OVX + ÁGUA ao grupo SHAM, e uma diminuição de TNF- α nos grupos tratados com VIT D 420 UI/Kg, VIT D 42 UI/Kg + DONE e VIT D 420 UI/Kg + DONE quando comparado ao grupo OVX + água (Figura 7A). Já os níveis de TNF- α no

hipocampo dessas ratas apresentou resultados diferentes. É possível observar um aumento dessa citocina nos grupos OVX + ÁGUA e no grupo OVX + VIT D 42 UI/Kg. Quando comparados com o grupo OVX + ÁGUA é possível observar uma diminuição em todos os demais grupos de tratamentos (Figura 7B).

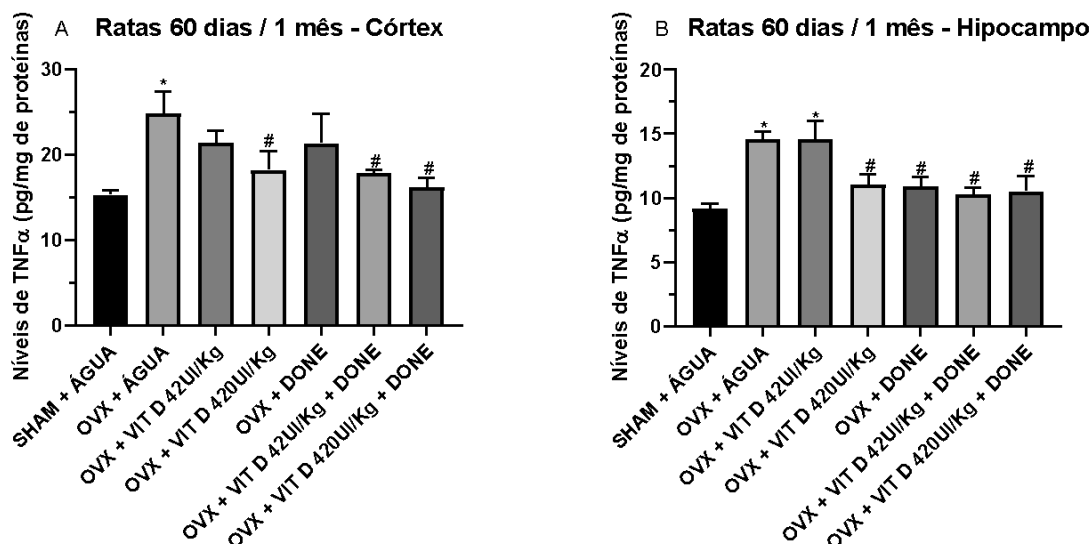


Figura 7: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de TNF- α no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 3-6. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle OVX. Abreviaturas: OVX (ovariectomia); Vit (vitamina); Done (donepezila).

A figura 8A mostra a dosagem de IL-10 no córtex e hipocampo das ratas com idade de 60 dias e submetidas a OVX durante 1 mês antes do início da administração medicamentosa. No córtex não foi possível observar nenhum aumento ou diminuição de IL-10 significativo, já no hipocampo houve um aumento significativo de IL-10 no grupo OVX + ÁGUA quando comparado ao grupo SHAM (Figura 8B).

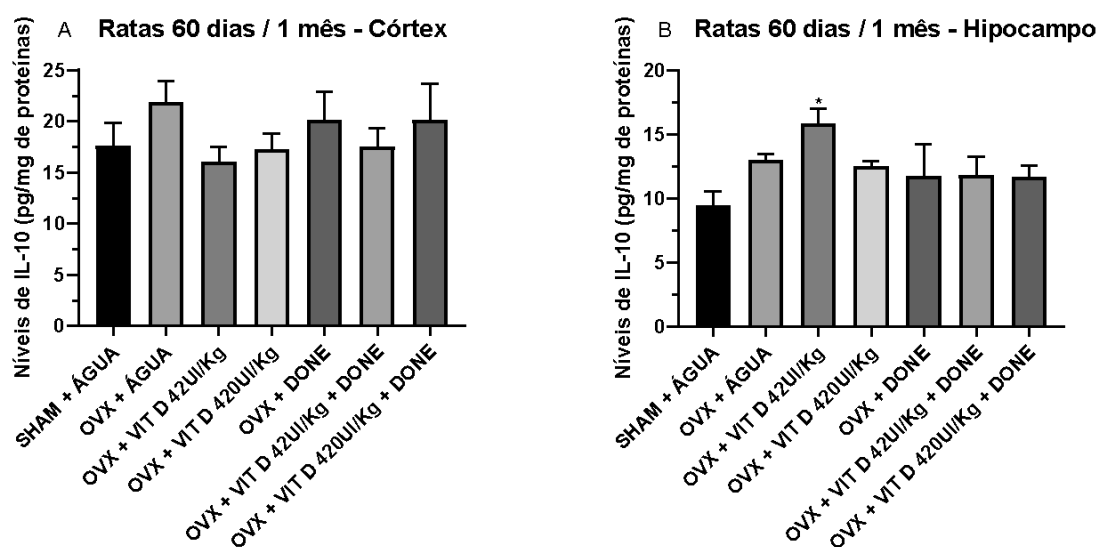


Figura 8: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n= 3-6$. * $p<0,05$ quando comparado com o grupo controle e # $p<0,05$ quando comparado com o grupo controle OVX. Abreviaturas: OVX (ovariectomia); Vit (vitamina); Done (donepezila).

Já a figura 9 mostra os resultados de IL-1 β no córtex (Figura 9A) e hipocampo (Figura 9B) das ratas com 60 dias de idade e submetidas a OVX durante 8 meses. É possível observar um aumento significativo nos níveis de IL-1 β no grupo OVX + ÁGUA quando comparado ao grupo SHAM, tanto no córtex quanto no hipocampo. Quando comparado os demais grupos com o grupo OVX + ÁGUA, é possível observar que com exceção do grupo OVX + VIT D 420 UI/Kg no hipocampo, em todos os grupos OVX que receberam tratamentos medicamentosos ocorreu uma diminuição nos níveis dessa citocina.

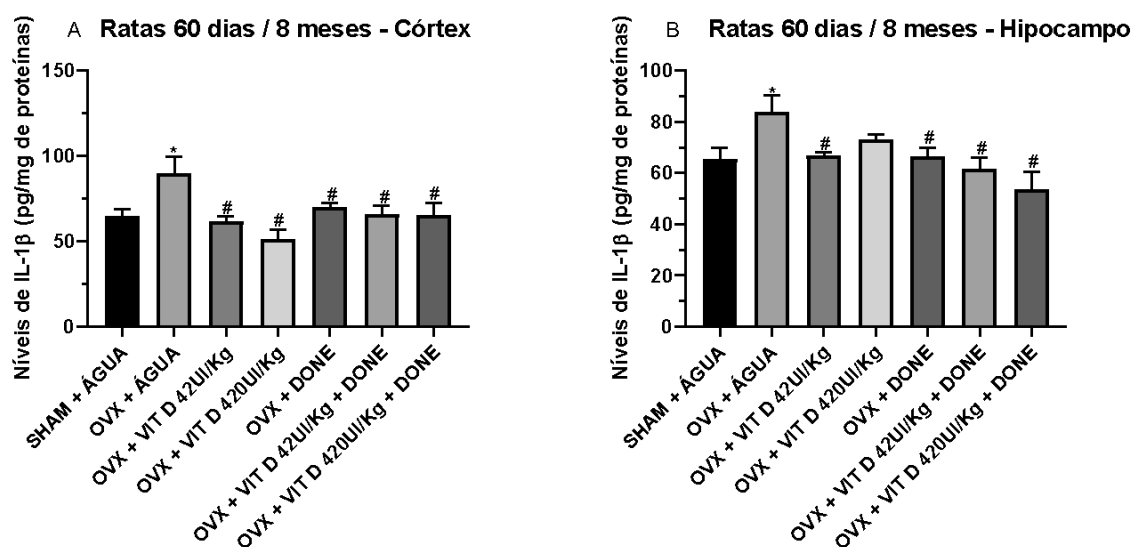


Figura 9: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 8 meses nos níveis de IL-1 β no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 3-6. *p<0,05 quando comparado com o grupo controle e #p<0,05 quando comparado com o grupo controle OVX. Abreviaturas: OVX (ovariectomia); Vit (vitamina); Done (donepezila).

Quando observado os resultados nos níveis de TNF α no córtex (Figura 10A) e hipocampo (Figura 10B) das ratas com 60 dias de idade e submetidas a OVX durante 8 meses, não foi possível observar nenhuma alteração significativa.

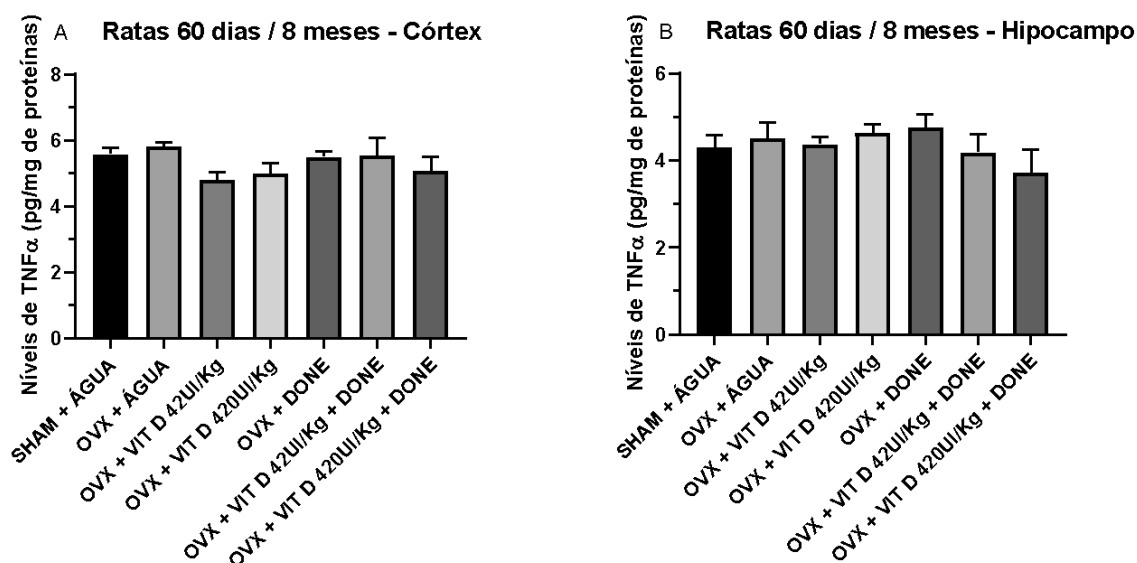


Figura 10: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 8 meses nos níveis de TNF- α no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 4-6. *p<0,05 quando comparado com o grupo controle e #p<0,05 quando comparado com o grupo controle OVX. Abreviaturas: OVX (ovariectomia); Vit (vitamina); Done (donepezila).

Na figura 11A é possível observar os níveis de IL-10 no córtex das ratas com 60 dias de idade e submetidas a OVX durante 8 meses. Houve um aumento significativo nos níveis de IL-10 quando comparado com o grupo SHAM nos grupos OVX + ÁGUA e OVX + VIT D 420 UI/Kg + DONE. Nos grupos OVX + VIT D 420 UI/Kg e OVX + DONE é possível observar uma diminuição significativa quando comparado ao grupo OVX + ÁGUA, e no grupo OVX + VIT D 42 UI/Kg a diminuição foi significativa quando comparada aos dois grupos, OVX + ÁGUA e SHAM. No hipocampo não foi possível observar resultados significativos nos níveis de IL-10 (Figura 11A).

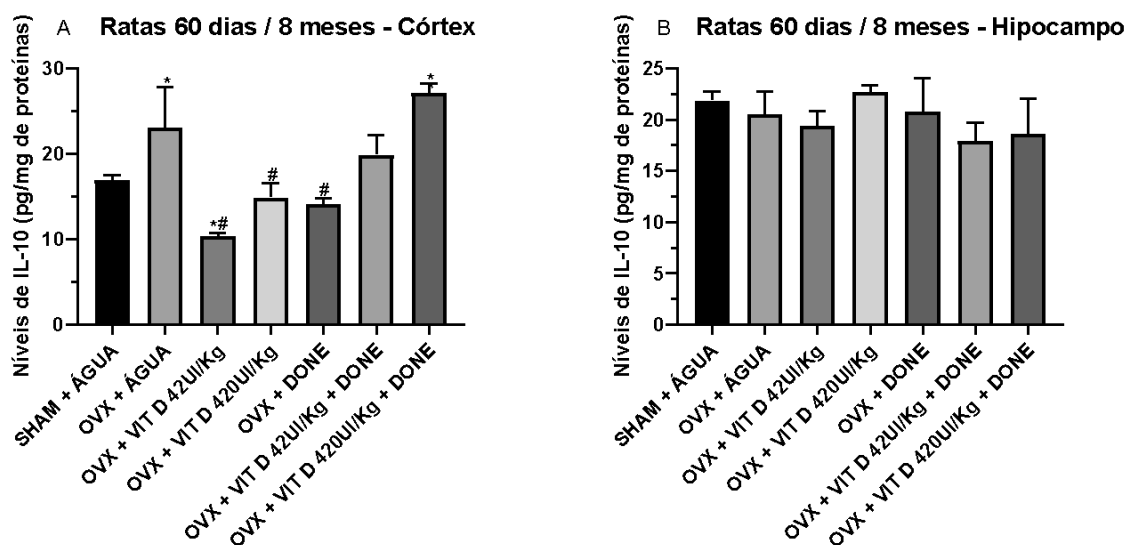


Figura 11: Ratas com 60 dias Sham ou ovariectomizadas durante 8 meses nos níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. * $p<0,05$ quando comparado com o grupo controle e # $p<0,05$ quando comparado com o grupo controle OVX. Abreviaturas: OVX (ovariectomia); Vit (vitamina); Done (donepezila).

A figura 12 mostra os resultados dos níveis de IL-1 β no córtex (Figura 12A) e hipocampo (Figura 12B) das ratas com 120 dias de idade e submetidas a OVX durante 1 mês. No córtex é possível observar que houve um aumento significativo dos níveis dessa citocina nos grupos OVX + ÁGUA e OVX + DONE, quando comparados ao grupo SHAM, e uma diminuição significativa no grupo OVX + VIT D 420 UI/Kg quando comparado ao grupo OVX + ÁGUA. No hipocampo não foi possível observar alterações significativas.

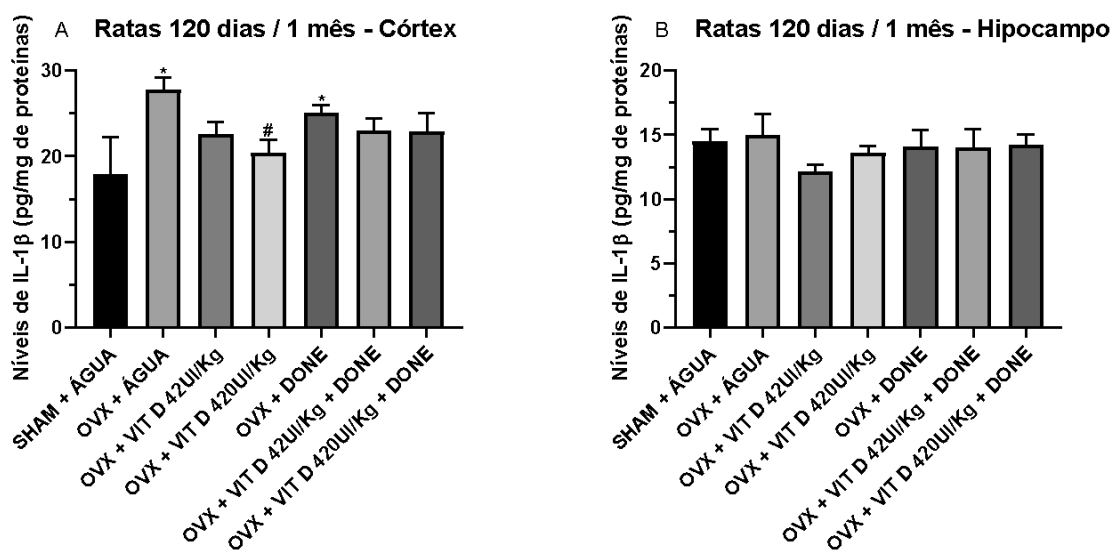


Figura 12: Ratas com 120 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de IL-1 β no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 3-6. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle OVX. Abreviaturas: OVX (ovariectomia); Vit (vitamina); Done (donepezila).

Os níveis de TNF α no córtex das ratas com 120 dias de idade e submetidas a OVX durante 1 mês, mostrou uma diminuição significativa nos grupos OVX + VIT D 42 UI/Kg e OVX + DONE quando comparados ao grupo SHAM. E nos grupos OVX + VIT D 420 UI/Kg, OVX + VIT D 42 UI/Kg + DONE e OVX + VIT D 420 UI/Kg + DONE essa diminuição foi significativa comparada ao grupo SHAM e ao grupo OVX + ÁGUA (Figura 13A). No hipocampo houve uma diminuição nos níveis dessa citocina quando comparada os grupos OVX + VIT D 42 UI/Kg, OVX + VIT D 420 UI/Kg e OVX + DONE com o grupo OVX + ÁGUA (Figura 13B).

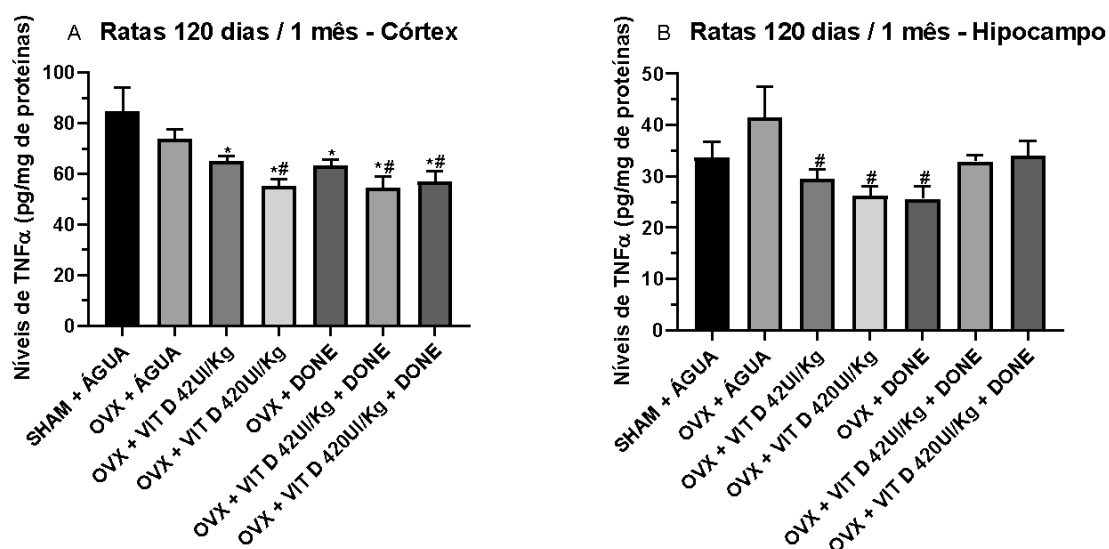


Figura 13: Ratas com 120 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de TNF- α no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, n= 3-6. *p<0,05 quando comparado com o grupo controle e #p<0,05 quando comparado com o grupo controle OVX. Abreviaturas: OVX (ovariectomia); Vit (vitamina); Done (donepezila).

Na figura 14A observa-se os níveis de IL-10 no córtex frontal das ratas com 120 dias de idade e submetidas a OVX durante 1 mês, mostraram uma diminuição significativa nos dois grupos de OVX e associação de medicações, VIT D 42 UI/Kg + DONE e VIT D 420 UI/Kg + DONE, quando comparados ao grupo SHAM e ao grupo OVX + ÁGUA. Já no hipocampo os níveis dessa citocina se mostraram aumentado nos mesmo grupos de associação quando comparados ao grupo SHAM e ao grupo OVX + ÁGUA (Figura 14B).

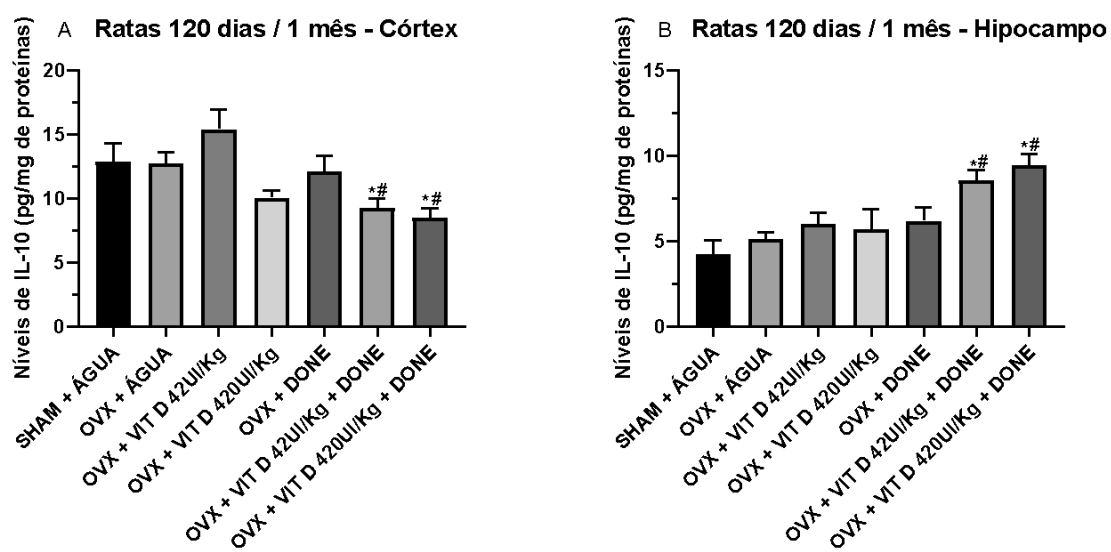


Figura 14: Ratas com 120 dias Sham ou ovariectomizadas durante 1 mês nos níveis de IL-10 no córtex frontal (A) e hipocampo (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 2-6$. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle OVX. Abreviaturas: OVX (ovariectomia); Vit (vitamina); Done (donepezila).

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo primeiramente avaliaram o efeito da OVX isolada ou associada ao envelhecimento nos níveis de citocinas como a IL-1 β , TNF- α e IL-10.

O envelhecimento é progressivo, universal e inevitável. É caracterizado pelo acúmulo de mudanças biológicas que levam a danos e declínio funcional. É também o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Kritsilis et al., 2018). Existem diversas hipóteses para o aumento dos casos de doenças neurodegenerativas com a idade, uma destas hipóteses é a alteração dos níveis de estrogênio circulantes e cerebrais (Li et al., 2014).

O estrogênio é um hormônio que pode ser localmente sintetizado no cérebro a partir do colesterol e através de enzimas que estão presentes em diversas partes do cérebro humano (Li et al., 2014). Além da produção local de estrogênio, também foi demonstrado que o cérebro possui receptores para este hormônio em diversas áreas, incluindo o hipocampo, que é uma das áreas de grande relevância para a memória (Sherwin e Henry, 2008).

Estudos demonstraram que a ativação de receptores cerebrais de estrogênio do tipo alfa melhorou a densidade dendrítica e a performance cognitiva em roedores (Boulware et al., 2013; Phan et al., 2011; Russell et al., 2019). Além da função celular, o estrogênio também possui propriedades relacionadas à inflamação no cérebro.

O envelhecimento é um estado inflamatório e pode apresentar biomarcadores específicos incluindo a IL-6, IL-1 β , IL-18 e o TNF- α (Bektas et al., 2017). Estudos demonstraram que o estrogênio (E2) reduz a resposta cerebral inflamatória, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6. Além disso, inibe a expressão proteica de NF-KB, que são moléculas chave no início da inflamação cerebral (Wang et al., 2021., Bektas et al., 2017). Dada toda essa função do E2 no cérebro (modulação das espinhas dendríticas, alteração da densidade sináptica, alterações na conectividade e redução da matéria cinzenta), é esperado que sua redução leve a alterações cognitivas. A OVX causa redução abrupta nos níveis dos hormônios, especialmente o estrogênio em ratas, sendo assim um modelo útil para avaliação de inflamação e alterações cognitivas

(Russel et al., 2019). De fato, neste estudo foi observado que a OVX, induziu aumento dos níveis citocinas, principalmente IL-1 β , mas também TNF- α , no córtex frontal e hipocampo de ratas ovariectomizadas.

No presente estudo, a avaliação dos níveis de IL-1 β no córtex das ratas com 60 dias de idade e submetidos a OVX durante 1 mês mostrou aumento significativo no grupo OVX + água em relação ao grupo Sham. Um estudo conduzido por Wyse et al. (2019), mostrou resultado similar quando avaliou os níveis de IL-1B após OVX em astrócitos do hipocampo de ratas ovariectomizadas, embasando a teoria que os níveis reduzidos de E2 diminuem a proteção antiinflamatória do estrogênio no tecido cerebral, aumentando citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β .

A vitamina D é postulada como neuroprotetora devido sua capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica (Lang et al., 2019). Estudos mostram que atua preservando a cognição e inibindo doenças neurodegenerativas como a DA. Ainda não se sabe seu mecanismo, porém reduz a inflamação no SNC causada pelo envelhecimento e redução do estrogênio (Pozzi et al., 2013; Kraner et al., 2014). No estudo atual, níveis de IL-1 β diminuíram nas ratas com 60 dias submetidas a OVX durante 1 mês e tratadas com VIT D 420 UI/Kg quando comparado ao grupo OVX + água. Em estudo avaliando obesidade e ingestão calórica, os níveis de IL-1 β foram similarmente avaliados no hipocampo de ratos após tratamento com Vitamina D e, como no estudo atual, demonstraram redução importante quando comparados com o grupo controle (Farhngi et al., 2017).

Diversos fármacos foram testados para o tratamento da DA e melhora da cognição. Uma destes, é a donepezila, que funciona como um inibidor da enzima acetilcolinesterase, mantendo a acetilcolina mais tempo na fenda sináptica (Scheltens et al., 2016). No presente estudo, ratas com 60 dias de vida e ovariectomizadas durante 1 mês e que foram tratadas isoladamente com donepezila, não tiveram redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-1B quando comparadas com o grupo controle. Um estudo conduzido por Deng et al. (2019) também não mostrou diferença estatística destes níveis quando comparado ao grupo controle, apesar de demonstrada ação antiinflamatória via redução de algumas vias inflamatórias específicas.

Neste estudo, quando associado o tratamento de vitamina D em diferentes doses com donepezila em ratas com 60 dias de idade e submetidos a OVX durante

8 meses antes do início do tratamento, houve redução dos níveis de IL-1 β . Quando realizada busca em bases científicas, não foram encontrados estudos na literatura com esta associação, porém, este resultado pode ser decorrente somente do uso da vitamina D ou de uma possível potencialização de efeito com esta associação.

No córtex frontal e no hipocampo dos animais submetidos a este mesmo protocolo, houve aumento dos níveis de TNF α quando comparado o grupo OVX + ÁGUA ao grupo SHAM, e uma diminuição de TNF- α nos grupos tratados quando comparado ao grupo OVX + água. Similarmente, estudo de Wang et al. (2021) e de Wyze et al. (2019), demonstraram aumento dos níveis de TNF- α em cérebro de ratas ovariectomizadas. Estudo de Wang et al. (2021), também demonstrou redução destes níveis quando realizado tratamento com donepezila, sugerindo um potencial de atuação deste fármaco nesta via, corroborado pelo trabalho atual. Além disso, foi observado, neste estudo, a dosagem de IL-10 no córtex e hipocampo das ratas com idade de 60 dias e submetidas a OVX durante 1 mês. No córtex não foi possível observar nenhum aumento ou diminuição dos níveis de IL-10 significativo, já no hipocampo houve um aumento significativo destes níveis no grupo OVX + ÁGUA quando comparado ao grupo SHAM. No estudo de Wyze et al. (2019), diferente do atual, demonstrou redução significativa dos níveis de IL-10 no córtex e hipocampo das ratas. Essa diferença provavelmente ocorreu pela idade em que as ratas foram ovariectomizadas e avaliadas, tendo um tempo mais prolongado (180 dias) que o estudo atual. Portanto, talvez este tempo não foi o suficiente para reduzir os níveis da mesma. Além disso, o tratamento com vitamina D isolada ou associada não alterou os resultados da OVX.

Neste estudo também foi observado resultados de IL-1 β no córtex e hipocampo das ratas com 60 dias de idade e submetidas a OVX durante 8 meses. Foi visto um aumento significativo nos níveis de IL-1 β no grupo OVX e água quando comparado ao grupo SHAM, tanto no córtex, quanto no hipocampo. Sendo que comparativamente com as ratas com 60 dias e submetidas a OVX durante 1 mês, demonstraram níveis mais elevados desta IL-1 β , sugerindo aumento decorrente da inflamação do próprio envelhecimento. Quando comparado os demais grupos com o grupo OVX + ÁGUA, é possível observar que com exceção do grupo OVX + VIT D 420 UI/Kg no hipocampo, em todos os grupos OVX que receberam tratamentos medicamentosos ocorreu uma diminuição dessa citocina, sugerindo, como nos

demais estudos similares (Wize et al., 2019) um efeito anti-inflamatório destes tratamentos, que neste caso, foi independente do tempo de OVX.

Quando observado os resultados de TNF α no córtex e hipocampo das ratas com 60 dias de idade e submetidos a OVX durante 8 meses, não foi possível observar nenhuma alteração significativa. Porém, estes níveis em comparação com o resultado após 1 mês, se mostraram mais elevados, corroborando com a hipótese inflamatória do envelhecimento (Frasca et al., 2020).

Também é possível observar os níveis de IL-10 no córtex das ratas com 60 dias de idade e submetidos a OVX durante 8 meses. Houve um aumento significativo nos níveis de IL-10 no córtex frontal e houve uma redução após tratamento com vitamina D isoladamente e donepezila isoladamente, porém, a associação de vitamina D e donepezila não demonstrou benefício. Quando comparado ao estudo de Wyze et al (2019), os resultados no córtex, neste grupo, se mostraram similares, provavelmente pelo tempo entre a OVX e o tratamento, que foram parecidos nos dois estudos. No hipocampo não houve resultados significativos.

Da mesma maneira, quando mensurados os níveis de IL-1 β no córtex e hipocampo das ratas com 120 dias de idade e submetidos a OVX durante 1 mês é possível observar que houve um aumento significativo dessa citocina no córtex dos grupos da ovariectomia, quando comparados ao grupo SHAM, e uma diminuição significativa no grupo tratado com a vitamina D, sugerindo propriedades anti-inflamatórias com o uso desta vitamina, diferente do estudo de Wyse et al. (2018), onde não observou diferença nestes grupos. Essa falta de semelhança entre os estudos provavelmente também se deve ao fato de os tempos de OVX e tratamento terem sido diferentes entre os estudos. Não foram encontrados estudos com tempo de OVX e tratamento similares ao atual, mostrando a importância deste estudo para a avaliação temporal da OVX, com o intuito de entender o papel dela no envelhecimento e podendo futuramente relacionar com a clínica.

Os níveis de TNF α no córtex das ratas com 120 dias de idade e submetidas a OVX durante 1 mês, mostraram uma diminuição significativa nos grupos tratados com vitamina D isoladamente, donepezila isoladamente e com a associação. Nestas ratas, os níveis de TNF- α , quando comparados os grupos SHAM e OVX não se mostraram com diferença estatística, sugerindo também, conforme demais

resultados, uma influência do envelhecimento isoladamente na inflamação cerebral (Frasca et al., 2020).

Por fim, quando avaliados os níveis de IL-10 no córtex frontal das ratas com 120 dias de idade e submetidos a OVX durante 1 mês, houve uma diminuição significativa nos dois grupos das associações, quando comparados ao grupo SHAM e ao grupo OVX + ÁGUA. Porém, no hipocampo, houve aumento desta citocina com o tratamento combinado de donepezila e vitamina D. Conforme mencionado, não foram encontrados estudos demonstrando essa associação.

É importante ressaltar que os resultados do presente estudo indicam que a OVX induz neuroinflamação. Porém, com o avançar do envelhecimento e como consequência, o processo inflamatório de baixo grau, o efeito inflamatório da OVX pode não ter sido observado. Contudo, a OVX pode estar alterando outras vias ou mesmo potencializando a neuroinflamação levando a prejuízos diversos, incluindo a cognição. É possível observar que a Vitamina D isolada ou associada pode ter efeito antiinflamatório, principalmente em estágios mais precoces da OVX.

6 CONCLUSÃO

Este estudo leva à conclusão de que os animais que foram submetidos a OVX tiveram aumento de neuroinflamação, principalmente por aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α e o tratamento destes animais com vitamina D isolada ou associada ao donepezila teve a capacidade de reverter este efeito inflamatório, reduzindo a neuroinflamação, principalmente em animais jovens e tratados na fase inicial e tardia da OVX.

REFERÊNCIAS

Alzheimer's Association, 2021. Disponível em: <<https://www.alz.org/>>. Acesso em: 27/03/2021.

Anjum I, Jaffery SS, Fayyaz M, Samoo Z, Anjum S. The Role of Vitamin D in Brain Health: A Mini Literature Review. *Cureus*. 2018; 10(7): e2960.

Bachmann MC, Bellalta S, Basoalto R, et al. The Challenge by Multiple Environmental and Biological Factors Induce Inflammation in Aging: Their Role in the Promotion of Chronic Disease. *Front Immunol*. 2020; 11: 570083.

Bektas A, Schurman SH, Sen R, Ferrucci L. Human T cell immunosenescence and inflammation in aging. *J Leukoc Biol*. 2017; 102(4): 977-988.

Bektas Arsun, Schurman Shepherd H, Sen Ranjan, Ferruccia Luigi. Aging, inflammation and the environment. *Exp Gerontol*. 2018; 105: 10-18.

Bińkowska M, Woroń J. Progestogens in menopausal hormone therapy. *Prz Menopauzalny*. 2015; 14(2): 134-43.

Birks JS, Harvey RJ. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018; 18; 6(6).

Branche ML, Brun LR, Di Loreto VE, Lupo M, Rigalli A. Sequential treatment with monofluorophosphate and zoledronic acid in osteoporotic rats. *Climacteric*. 2014; 17(4): 478-85.

Briones TL; Darwish H. Vitamin D mitigates age-related cognitive decline through the modulation of pro-inflammatory state and decrease in amyloid burden. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 244.

Boulware, M. I.; Heisler, J. D.; Frick, K. M.. The Memory-Enhancing Effects of Hippocampal Estrogen Receptor Activation Involve Metabotropic Glutamate Receptor Signaling. *Journal Of Neuroscience*. Society for Neuroscience. 2013; 33(38): 15184-15194.

Caetano, L. M. O Idoso e a Atividade Física. *Horizonte: Revista de Educação Física e desporto*. 2006; 11(124): 20-28.

Cui, Xue et al. "Donepezil, a drug for Alzheimer's disease, promotes oligodendrocyte generation and remyelination." *Acta pharmacologica Sinica*. 2019; 40(11): 1386-1393.

De Abrantes, Rodrigo Sousa et al. Suplementação de vitamina D em mulheres na menopausa. *Revista Interdisciplinar em Violência e Saúde*. 2019; 2(1).

De Almeida, Áurea Beirão. Reavaliando o climatério: enfoque atual e multidisciplinar. Editora Atheneu. 2003; 474.

Deng, Yuanyuan; Ye, Lianzhi; Yu, Cheng; Yin, Caixia; Shijingshan; Gong, Qihai. Czech. Alleviates β -Amyloid-Induced Cognitive Impairment and Inflammation Response via Modulation of JNK and NF- κ B Pathway in Rats. *Behavioral Neurology*. Hindawi Limited. 2019; 2019: 1-10.

Dolitsky SN, Cordeiro Mitchell CN, Stadler SS, Segars JH. Efficacy of progestin-only treatment for the management of menopausal symptoms: a systematic review. *Menopause*. 2020; 28(2): 217-224.

Dominguez Ligia J, Farruggia Mario, Veronese Nicola, Barbagallo Mario. Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment. *Metabolites*. 2021; 11(4): 255.

Duan X, Li Y, Xu F, Ding H. Study on the neuroprotective effects of Genistein on Alzheimer's disease. *Brain Behav*. 2021; 11(5): e02100.

Farhangi, Mahdieh Abbasalizad; Mesgari-Abbasi, Mehran; Nameni, Ghazaleh; Haji Luian, Ghazaleh; Shahabi, Parviz. The effects of vitamin D administration on brain inflammatory markers in high fat diet induced obese rats. *Bmc Neuroscience*. Springer Science and Business Media LLC. 2017; 18(1): 1-8.

Frasca, Daniela; Diaz, Alain; Romero, Maria; Garcia, Denisse; Blomberg, Bonnie B.. B Cell Immunosenescence. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*. Annual Reviews. 2020; 36(1): 551-574.

Fulop T, Witkowski JM, Olivieri F, Larbi A. The integration of inflammaging in age-related diseases. *Semin Immunol*. 2018; 40: 17-35.

Fundo de População das Nações Unidas (UNFPA). Envelhecimento populacional. 2020.

Gems, David. What is an anti-aging treatment?. *Experimental Gerontology*. 2014; 58: 14-18.

Glass Christopher K, Saijo Kaoru, Winner Beate, Marchetto Maria Carolina, Gage Fred H. "Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration." *Cell*. 2010; 140(6): 918-934.

Hagen, Magdalena and Emmanuel Derudder. "Inflammation and the alteration of B-cell physiology in aging." *Gerontology*. 2020; 66(2): 105-113.

Hamdan Amer Cavalheiro and Ramos Ari Alex. Avaliação neuropsicológica na doença Alzheimer e demência frontotemporal: critérios nosológicos. *Interação Psicol*. 2016; 18(3): 7-391.

Hosseinezhad Arash and Holick Michael F. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc*. 2013; 88(7): 720-755.

Joe E, Ringman JM. Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: Clinical management and prevention. 2019; 6: 367-16217.

Kritsilis, Marios; Rizou, Sophia V.; Koutsoudaki, Paraskevi; Evangelou, Konstantinos; Gorgoulis, Vassilis; Papadopoulos. Dimitrios. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. International Journal Of Molecular Sciences. MDPI AG. 2018; 19 (10): 2937.

Kositsawat Jatupol and Geraci Stephen A. Screening for vitamin D deficiency in the elderly. J Miss State Med Assoc. 2010; 51(1): 7-10.

Kulda Vlastimil. Vitamin D metabolism. Vnitr Lek. 2012; 58(5):400-4.

la, Flores, Ricardo Antunes. Alterações celulares no envelhecimento humano. Journal of Oral Investigations. 2016; 5(1): 61-65.

Landel V, Annweiler C, Millet P, Morello M, Féron F. Vitamin D, Cognition and Alzheimer's Disease: The Therapeutic Benefit is in the D-Tails. J Alzheimers Dis. 2016; 11;53(2): 419-44.

Lang F, Ma K, Leibrock CB. 1,25(OH)₂D₃ in Brain Function and Neuropsychiatric Disease. Neurosignals. 2019;27(1):40-49.

Latimer CS, Brewer LD, Searcy JL, Chen K-C, Popovic J, Kraner SD. Vitamin D prevents cognitive decline and enhances hippocampal synaptic function in aging rats. Proc Natl Acad Sci. 2014;111(41): 4359–66.

Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia, Nature. 2017; 541(7638): 481-48.

LI, Rena; CUI, Jie; SHEN, Yong. Brain sex matters: estrogen in cognition and alzheimer's disease. *Molecular And Cellular Endocrinology*. 2014; 389 (1-2): 13-21.

Lobo RA, Davis SR, De Villiers TJ, Gompel A, Henderson VW, Hodis HN, Lumsden MA, Mack WJ, Shapiro S, Baber RJ. Prevention of diseases after menopause. *Climacteric*. 2014; 17(5): 540-56.

Lo E.H. Degeneration and repair in central nervous system disease. *Nat Med*. 2010; 16(11): 1205-9.

López-Baena MT, Pérez-Roncero GR, Pérez-López FR, Mezones-Holguín E, Chedraui P. Vitamin D, menopause, and aging: quo vadis? *Climacteric*. 2020; 23(2): 123-129.

Lowry, Oliver HO, Rosebrough, N. J, Farr, A. L., & Randall, R. J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *Journal of biological chemistry* 1951; 193: 265-275.

Ma Y, Liu M, Yang L, Zhang L, Guo H, Hou W, Qin P. Loss of Estrogen Efficacy Against Hippocampus Damage in Long-Term OVX Mice Is Related to the Reduction of Hippocampus Local Estrogen Production and Estrogen Receptor Degradation. *Mol Neurobiol*. 2020; 57(8): 3540-3551.

Miao, Yulian; Ren, Jianmin; Jiang, Ling; Liu, Jinbo; Jiang, Bei; Zhang, Xiaoli. α -lipoic acid attenuates obesity-associated hippocampal neuroinflammation and increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in ovariectomized rats fed a high-fat diet. *International Journal Of Molecular Medicine*. Spandidos Publications. 2013; 32 (5): 1179-1186.

Minhas PS, Latif-Hernandez A, McReynolds MR, Durairaj AS, Wang Q, Rubin A, Joshi AU, He JQ, Gauba E, Liu L, Wang C, Linde M, Sugiura Y, Moon PK, Majeti R, Suematsu M, Mochly-Rosen D, Weissman IL, Longo FM, Rabinowitz JD, Andreasson KI. Restoring metabolism of myeloid cells reverses cognitive decline in ageing. *Nature*. 2021; 590(7844): 122-128.

Mokhtari-Zaer A, Hosseini M, Salmani H, Arab Z, Zareian P. Vitamin D3 attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in rats by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Life Sci.* 2020; 15 (253): 117703.

Morgan KN, Derby CA, Gleason CE. Cognitive Changes with Reproductive Aging, Perimenopause, and Menopause. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018; 45(4): 751-763.

Nelson HD. Menopause. *Lancet.* 2008; 1;371(9614): 760-70.

Paciuc, John. "Hormone Therapy in Menopause." *Hormonal Pathology of the Uterus.* Springer, Cham, 2020; 89-120.

Pines A. Alzheimer's disease, menopause and the impact of the estrogenic environment. *Climacteric.* 201; 19(5): 430-2.

Phan, Anna; Lancaster, Karla E.; Armstrong, John N.; Maclusky, Neil J.; Choleris, Elena. Rapid Effects of Estrogen Receptor α and β Selective Agonists on Learning and Dendritic Spines in Female Mice. *Endocrinology.* The Endocrine Society. 2011; 152 (4): 1492-1502.

Pozzi F, Frajese GV, Frajese G. Vitamin D (Calcifediol) supplementation modulates NGF and BDNF and improves memory function in post- menopausal women: a Pilot study. *Endocrinology.* 2013.

Reid HMO, Chen-Mack N, Snowden T, Christie BR. Understanding Changes in Hippocampal Interneurons Subtypes in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Brain Connect.* 2021; 11(3): 159-179.

Remelli F, Vitali A, Zurlo A, Volpato S. Vitamin D Deficiency and Sarcopenia in Older Persons. *Nutrients.* 2019; 11(12):2861.

Remelli F, Vitali A, Zurlo A, Volpato S. Vitamin D Deficiency and Sarcopenia in Older Persons. *Nutrients*. 2019; 11(12): 2861.

Rocca, Walter A, Brandon R, Grossardt and Lynne T. Shuster. "Oophorectomy, estrogen, and dementia: a 2014 update." *Molecular and cellular endocrinology*. 2014; 389(1-2), 7-12.

Russell, Jason K.; Jones, Carrie K.; Newhouse, Paul A.. *The Role of Estrogen in Brain and Cognitive Aging*. Neurotherapeutics. Springer Science and Business Media LLC. 2019; 16 (3): 649-665.

Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(18): 6573.

Scheltens, Philip; Blennow, Kaj; Breteler, Monique M B; Strooper, Bart De; Frisoni, Giovanni B; Salloway, Stephen; Flier, Wiesje Maria Van Der. Alzheimer's disease. *The Lancet*. Elsevier BV. 2016; 388 (10043): 55-517.

Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology*. 2020; 40(1):22-29.

Sereniki, Adriana, and Maria Aparecida Barbato Frazão Vital. Alzheimer's disease: pathophysiological and pharmacological aspects. *Journal of Psychiatry of Rio Grande do Sul*. 2008; 30(1).

Sherwin, Barbara B.; Henry, Jessica F.. Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review. *Frontiers In Neuroendocrinology*. Elsevier BV. 2008; 29 (1): 88-113.

Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, Woods N. Inflamação e fragilidade em idosos: uma revisão sistemática e meta-análise. *Aging Res Rev*. 2016; 31: 1-8.

Spieler D, Namendorf C, Namendorf T, von Cube M, Uhr M. c. J Psychiatr Res. 2020; 124: 29-33.

Takada-Takatori Y, Kume T, Ohgi Y, Izumi Y, Niidome T, Fujii T, Sugimoto H, Akaike A. Mechanism of neuroprotection by donepezil pretreatment in rat cortical neurons chronically treated with donepezil. J Neurosci Res. 2008; 86(16): 3575-83.

Tempfer CB, Hilal Z, Kern P, Juhasz-Boess I, Rezniczek GA. Terapia hormonal na menopausa e risco de câncer endometrial: uma revisão sistemática. Câncer (Basel). 2020; 12(8): 2195.

Wang, J., Hou, Y., Zhang, L. et al. Estrogen Attenuates Traumatic Brain Injury by Inhibiting the Activation of Microglia and Astrocyte-Mediated Neuroinflammatory Responses. Mol Neurobiol. 2021; 58, 1052–1061.

Waterhouse JC, Perez TH, Albert PJ. Reversing bacteria- induced vitamin D receptor dysfunction is key to autoimmune disease. Annals of the New York Academy of Science. 2009; 1173: 757-765.

Webb AR, DeCosta BR, Holick MF. Sunlight Regulates the Cutaneous Production of Vitamin D3 by Causing Its Photodegradation. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1989; 68: 882–887.

Wyse, Angela Ts; Siebert, Cassiana; Bobermin, Larissa D; Santos, Tiago M Dos; Quincozes-Santos, André. Changes in Inflammatory Response, Redox Status and Na⁺, K⁺-ATPase Activity in Primary Astrocyte Cultures from Female Wistar Rats Subject to Ovariectomy. Neurotoxicity Research. Springer Science and Business Media LLC. 2019; 37(2): 445-454.

Xia X and Han JJ. Systems Biology in Aging Research. Adv Exp Med Biol. 2018; 1086: 1-15.

Yang Y, Zhao L, Li N, Dai C, Yin N, Chu Z, Duan X, Niu X, Yan P, Lv P. Estrogen Exerts Neuroprotective Effects in Vascular Dementia Rats by Suppressing Autophagy and Activating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Neurochem Res.* 2020; 45(9): 2100-2112.

Zhang ZD, Milman S, Lin JR, Wierbowski S, Yu H, Barzilai N, Gorbunova V, Ladiges WC, Niedernhofer LJ, Suh Y, Robbins PD, Vijg J. Genetics of extreme human longevity to guide drug discovery for healthy ageing. *Nat Metab.* 2020; 2(8): 663-672.

ANEXO A. Carta de aprovação na CEUA



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



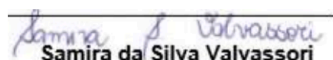
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **20/04/2021**.

Título do projeto	Avaliação do efeito da vitamina D e associações em ratas ovariectomizadas adultas e envelhecidas
Project title	Evaluation of the effect of vitamin D and associations on adult and aged ovariectomized rats
Número do protocolo Protocol number	123/2019 ADENDO
Pesquisador principal Principal Investigator	JOSIANE BUDNI
Pesquisadores Researchers	Débora Borges Tomaz, Eduarda Behenck Medeiros, Gabriel Casagrande Zobot, Natália Baltazar do Nascimento, Nathália de Souza Pereira, Bianca de Oliveira Cruz, Joice Regina Gabriel, Fernanda Alves de Lima, Mikaelly Campos Joaquim, Carolina Giassi Alano, Laura Ceolin de Jesus, Lara Xavier Bazotti, Gabrielli Martins, Maria Laura Cecconi dos Santos, Ana Carolina Nunes Colombo, Amanda Boaventura, Paula Abatti Moretto, Maria Laura Cecconi dos Santos, Lauren Marfil Marins, Lia Beatriz Spillere Olivo, Magson Júnior de Souza, Ariandne de Oliveira Marques, Ana Carolina Nunes Colombo, Lisienny Campoli Tono Rempel, Adrielly Vargas, Joice Regina M Gabriel, Bárbara Machado Napolini Macarini,
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	16/12/2020 a 15/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Idade/Peso	210 animais com 60 dias e 210 animais com 120 dias / 250-350 gramas
Número de animais	420 Feminino = 420
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 20 de Abril de 2021.


Samira da Silva Valvassori

Coordenadora Adjunta da CEUA



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
 PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
 DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
 Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 389

Com início às 15h (quinze horas) do dia vinte e cinco de fevereiro de 2022 (dois mil e vinte e dois), realizou-se, via ferramenta digital Google Meet, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **JOICE REGINA MARCILIO GABRIEL**, sob a orientação do **Profa. Dra. Joslane Budni**, intitulada **“ENVOLVIMENTO DA NEUROINFLAMAÇÃO NO EFEITO DA VITAMINA D E DONEPEZILA EM RATAS OVARIETOMIZADAS ADULTAS E ENVELHECIDAS”**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: **Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus** (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, **Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico** (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovada e **Profa. Dra. Michelle Lima Garcez** (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesseis horas), dos quais eu, **Fernanda Nunes Peruchi**, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o **Prof. Dr. Emílio Luiz Streck**, Coordenador do Programa. Criciúma, 25 (vinte e cinco) de fevereiro de 2022 (dois mil e vinte e dois).

Prof. Dr. Emílio Luiz Streck
 Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
 Assistente Administrativo