

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ANDRIELLE ARAÚJO OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE PREJUÍZO COGNITIVO E DE ALTERAÇÕES
CROMATÍNICAS E OXIDATIVAS EM ENCÉFALOS DE CAMUNDONGOS
IDOSOS E ADULTOS MADUROS APÓS SUPLEMENTAÇÃO
ALIMENTAR COM FORTASYN CONNECT

UBERLÂNDIA

2017

ANDRIELLE ARAÚJO OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE PREJUÍZO COGNITIVO E DE ALTERAÇÕES
CROMATÍNICAS E OXIDATIVAS EM ENCÉFALOS DE CAMUNDONGOS
IDOSOS E ADULTOS MADUROS APÓS SUPLEMENTAÇÃO
ALIMENTAR COM FORTASYN CONNECT

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Biologia
Celular e Estrutural Aplicadas, do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito
parcial à obtenção do título de mestre em
Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Alberto da
Silva Moraes

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48a
2017 Oliveira, Andrielle Araújo, 1990
Avaliação de prejuízo cognitivo e de alterações cromatínicas e oxidativas em encéfalos de camundongos idosos e adultos maduros após suplementação alimentar com Fortasyn Connect [recurso eletrônico] / Andrielle Araújo Oliveira. - 2017.

Orientador: Alberto da Silva Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1351>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. 2. Envelhecimento. 3. Nutrição. 4. Stress oxidativo. I. Moraes, Alberto da Silva, 1978, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número: 005/2017 do PPGBC

Data: 10 de Março de 2017

Discente: **Andrielle Araújo Oliveira**

Matrícula nº 11512BCE001

Título do Trabalho: ***"Avaliação de prejuízo cognitivo e de alterações cromatínicas e oxidativas em encéfalos de camundongos idosos, e sua modulação por intervenção nutricional"***

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual

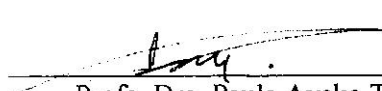
Projeto de Pesquisa vinculado: -----

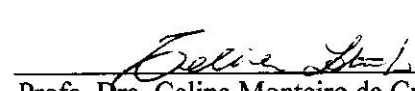
Às quatorze horas do dia dez de março do ano de 2017 no Auditório do Bloco 4K - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Paula Ayako Tiba/Universidade Federal do ABC; Celina Monteiro da Cruz Lotufo/UFU e Alberto da Silva Moraes orientador da candidata. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes - apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, às examinadoras, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

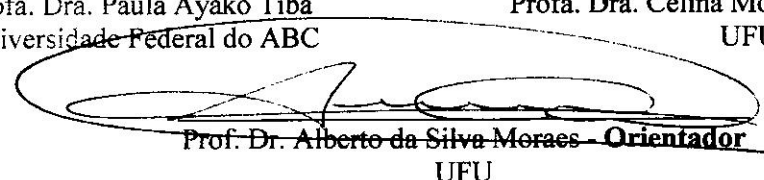
Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Andrielle Araújo Oliveira** Aprovado. Sugerindo, (se couber) o novo título para o trabalho:

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17 horas e 45 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dra. Paula Ayako Tiba
Universidade Federal do ABC


Prof. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo
UFU


Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes - Orientador
UFU

À minha família, porque nela está sempre a minha base, o meu refúgio.
Aos queridos amigos, de longe e de perto, de agora e de antes, cuja presença em minha vida
tem feito de mim alguém melhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, segundo a minha fé, por essa oportunidade de passar pela experiência do mestrado nesta cidade, que é ainda nova para mim, onde conheci amigos e pessoas muito importantes na minha vida.

Aos meus pais, Maria Margarida e Alteclei, pelas palavras e pelo exemplo, e sua simples existência, que é muito preciosa para mim.

Ao meu noivo, Junior, por todo o apoio emocional, sempre conseguindo se fazer presente, mesmo distante geograficamente.

Ao professor Alberto por ter aceitado me orientar neste trabalho, pela paciência e compreensão.

À minha querida amiga Vanessa, “irmã” de mesmo orientador, que o mestrado me deu de presente.

À CAPES, por possibilitar a muitos, como eu, a oportunidade de estar na pós-graduação.

Ao professor Tarciso, e suas alunas, Rafaela e Natália, pela colaboração nos testes cognitivos.

Aos alunos da professora Françoise do INGEB, Larissa e Omero, pela ajuda nos dias de eutanásia, coleta de materiais, análises bioquímicas, e experimentos para outros trabalhos.

Ao professor Cláudio, e sua aluna Nadjânia, pela ajuda com a liofilização.

À professora Neide, e seus alunos, Rômulo, Marcos Paulo, e Natália, que deram auxílio com relação aos animais no biotério e centrifugações no IMPAT.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, pela estrutura, pelos professores, e auxílio de todo o corpo técnico-administrativo, em especial a Juscélia, Esther, Fabrício, Mariani, Renata, Christiane, e Mário.

E, por fim, a todos os que suavizaram esta caminhada, nem que fosse com um bate-papo ou um sorriso pelos corredores do ICBIM.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

Professor Fernando Teixeira de Andrade

RESUMO

O envelhecimento afeta todos os organismos eucariotos unicelulares e multicelulares, e é causado por modificações ocorridas e acumuladas em nível molecular, que por sua vez levam a mudanças morfofisiológicas, com risco aumentado para diversas doenças crônicas e um declínio geral na capacidade cognitiva do indivíduo. Em nível celular, junto dessas alterações funcionais, é possível perceber alterações estruturais, como na cromatina, por exemplo. Algumas alterações cromatínicas são responsáveis por alterações na expressão de genes relacionados à formação de memória, acarretando em déficits cognitivos que podem estar associados a doenças neurológicas no envelhecimento, como a doença de Alzheimer, por exemplo. Considerando a influência do estado nutricional sobre as funções cognitivas e a capacidade antioxidante celular, o presente trabalho visou experimentar a fórmula Fortasyn Connect como suplementação alimentar para camundongos sem a doença de Alzheimer. Camundongos C57/Bl6 adultos maduros e idosos receberam dieta suplementada ou dieta convencional; em seguida foram submetidos a testes cognitivos comportamentais. Após eutanásia dos camundongos, seus encéfalos foram dissecados de forma integral. Neurônios e gliócitos foram isolados para análise de imagens de parâmetros de organização da cromatina. Parte do homogenato encefálico inicial foi testado bioquimicamente para marcadores de estresse oxidativo. Com base no que foi observado no labirinto em cruz elevado e no labirinto aquático de Morris, as alterações de desempenho de memória/aprendizado com a idade foram melhoradas pela suplementação alimentar. Porém, as alterações encontradas nos parâmetros morfométricos de organização da cromatina mostram que a suplementação, tanto em neurônios como em gliócitos, levou a perfis morfológicos nucleares típicos de envelhecimento em animais adultos maduros, e exacerbação dessas características em animais idosos. No caso dos marcadores de estresse oxidativo, não foi encontrada relação com os demais resultados.

Palavras-chave: envelhecimento, cognição, cromatina, nutrição, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Aging affects all unicellular and multicellular eukaryotic organisms, and is caused by changes occurring and accumulated at molecular level. Such molecular changes lead to morphophysiological alterations, which increase the risk for several chronic diseases and a general decline in cognitive capacity. At cellular level, along with these functional alterations, it is possible to perceive structural alterations, such as chromatin changes. Some chromatin changes are responsible for altered expression of genes related to memory formation, which may lead to cognitive deficits associated with neurological diseases in aging, for instance Alzheimer's disease. Considering the influence of nutrition on cognitive functions and on cellular antioxidant capacity, we proposed the investigation of the Fortasyn Connect formula as food supplementation for mice without Alzheimer's disease. Mature and elderly C57/Bl6 mice received either a supplemented or a conventional diet; then, they underwent cognitive behavioral tests. After euthanasia of the mice, their brains were integrally dissected. Neurons and gliocytes were isolated for image analysis of chromatin organization parameters. Part of the initial brain homogenate was biochemically tested for oxidative stress markers. From what was observed in the elevated plus maze and in the Morris water maze, memory/learning performance alterations with age were improved by dietary supplementation. However, alterations found in the morphometric parameters of chromatin organization show that supplementation in both neurons and gliocytes has led to typical aging morphological profiles in mature adult animals and further aggravation of these characteristics in the elderly ones. Regarding oxidative stress markers, no association was found concerning the other results.

KEY-WORDS: Aging, cognition, chromatin, nutrition, oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI - ácidos graxos poliinsaturados

CCL - Comprometimento Cognitivo Leve

EROS - espécies reativas de oxigênio

FC - *Fortasyn Connect*

IOD – densidade óptica integrada

LAM – Labirinto Aquático de Morris

LCE – Labirinto em Cruz Elevada

MDA - malondialdeído

OC – objeto conhecido

OD – densidade óptica média

ON - objeto novo

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (inibidor de serino proteases)

PTMs - *Post-translational modifications*

RC – Restrição Calórica

SAHF - *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*

TBA - ácido tiobarbitúrico

TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRO – Tarefa de Reconhecimento de objetos

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Variações de massa corporal nos diferentes grupos, antes, durante, e após aplicação dos testes cognitivos.....	35
Gráfico 2. Comparativo das razões TL1/TL2 entre os grupos experimentais - LCE.	37
Gráfico 3. Índice de discriminação do objeto novo – TRO.	39
Gráfico 4. Desempenho de memória/aprendizado no LAM.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise da distribuição dos parâmetros avaliados para os neurônios.	42
Figura 2. Análise da distribuição dos parâmetros avaliados para os gliócitos.	44
Figura 3. Núcleos de neurônios e gliócitos após a reação de Feulgen.	45
Figura 4. Parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição comparada das rações controle e suplementada.	25
Tabela 2. Massa corporal dos animais antes e depois da suplementação.	34
Tabela 3. Resultados de tempos de latência e razão TL1/TL2 no LCE de todos os grupos.	36
Tabela 4. Resultados de todos os grupos com relação ao desempenho de memória/aprendizado na TRO.	38
Tabela 5. Parâmetros de análise de imagem para neurônios corados após reação de Feulgen.	40
Tabela 6. Parâmetros de análise de imagem para gliócitos corados após reação de Feulgen.	43

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
	2.1 O núcleo celular, a estrutura da cromatina, e como esta pode ser remodelada.	15
	2.2 Senescência celular, estresse oxidativo e remodelação da cromatina no envelhecimento do sistema nervoso.	17
	2.3 Envelhecimento, declínio cognitivo, e aspectos nutricionais.	19
3.	OBJETIVOS.....	23
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
	4.1 Animais.....	24
	4.2 Suplementação alimentar.....	25
	4.3 Testes comportamentais.....	27
	4.4 Coleta de material biológico:.....	30
	4.5 Isolamento de neurônios e gliócitos	30
	4.6 Citoquímica e análise de imagens.....	31
	4.7 Análise de marcadores de estresse oxidativo.....	32
	4.8 Análise estatística	33
5.	RESULTADOS	34
	5.1 O envelhecimento em camundongos afeta negativamente o desempenho em memória/aprendizado em alguns testes comportamentais, e a suplementação reverte os efeitos.	34
	5.1.1 Massa corporal dos animais após dieta.....	34
	5.1.2 Labirinto em Cruz Elevado.....	35
	5.1.3 Tarefa de Reconhecimento de Objetos	37
	5.1.4 Labirinto Aquático de Morris	39
	5.2 Envelhecimentos, alterações funcionais, e alterações cromatínicas em neurônios e gliócitos de camundongos.	40
	5.3 Parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo	46
6.	DISCUSSÃO.....	47
7.	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXO A	65
	APÊNDICE A.....	66

1. INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, o envelhecimento populacional testemunhado atualmente tem sido consequência de quedas acentuadas nas taxas de natalidade combinadas com o aumento na expectativa de vida, sendo que, atualmente, pela primeira vez na história, a maioria das pessoas pode esperar viver até os 60 anos ou mais, sendo estimado o dobro da população mundial atual com idade superior a 60 anos para o ano de 2050 (WHO, 2015).

Entretanto, infelizmente, o aumento da expectativa de vida não tem refletido um envelhecimento saudável, ao passo que se observa, ao mesmo tempo, aumenta da prevalência das doenças crônicas, como diabetes tipo 2 e câncer, por exemplo (ZONCU, R. et al., 2011). Além disso, tem aumentado também a prevalência de distúrbios cognitivos na população à medida que esta envelhece (SOSA, A. L., et al, 2012).

Mesmo com o impacto indubitável das doenças sistêmicas sobre a saúde e o bem-estar em humanos, a falência das funções cerebrais determina um tipo de “morte precoce”, em que a essência do indivíduo se perde antes mesmo que seu corpo se entregue ao inevitável (WYSS-CORAY, T. 2016).

Em nível biológico, o envelhecimento é retratado, de forma geral, como um processo de deterioração tecidual que ocorre gradualmente, com danos oxidativos às macromoléculas celulares, como o DNA genômico e mitocondrial, proteínas, carboidratos e lipídios (KIRKWOOD, T. B. L, 2003; UNO, M., NISHIDA, E., 2016). Em mamíferos, conforme o corpo envelhece, o sistema nervoso passa por mudanças naturais, em que o cérebro e a medula espinhal perdem células nervosas e peso (atrofia) (RAZ, N. 2000; SALAT, D. H. et al., 2004). Além disso, a atrofia de nervos pode afetar os sentidos, com perda ou redução dos reflexos e das sensações, levando a problemas de movimento, e preocupações com a integridade física das pessoas idosas (HICKS, L. H.; BIRREN, J. E. 1970).

Vários estudos com pequenos animais de ciclo de vida curto, como *Caenorhabditis elegans*, por exemplo, (VAN DER HORST, A, et al. 2007), e também estudos com mamíferos (CUTLER, R G., 1991) mostram que há vários genes envolvidos em processos antioxidantes, de regulação do metabolismo, e efeito antibacteriano, cuja modulação de expressão poderia aumentar o tempo de vida de um organismo, ou retardar o processo de envelhecimento (ADAMS, J. U. 2008).

Com o envelhecimento, esses genes têm seu padrão de expressão alterado, de forma a tornar bem menos eficientes os mecanismos que protegem e renovam as células e os tecidos dos organismos (RODRÍGUEZ-RODERO, et al, 2011). Junto dessas alterações funcionais

nas células, é possível perceber alterações estruturais na cromatina, a macromolécula que consiste em DNA associado a proteínas histonas, em cujas modificações pós-traducionais têm-se muitas das alterações epigenéticas relacionadas ao envelhecimento (DIMAURO, T.; DAVID, G., 2009). Algumas dessas alterações são responsáveis pela diminuição da expressão de genes relacionados à formação de memória, acarretando em déficits cognitivos associados a doenças neurológicas que aparecem com o envelhecimento, como a Doença de Alzheimer, por exemplo (SEN., 2015).

Sinais ambientais, tais como hábitos alimentares, diferentes graus de intensidade de atividade física, estresse, entre outros fatores, podem modular a organização da cromatina, e assim, ter impacto sobre a regulação de diversos genes relacionados ao tempo de vida de um organismo (BENAYOUN, B. A.; POLLINA, E. A.; BRUNET, A., 2015). Como exemplo disso, dietas de restrição calórica estão relacionadas com o aumento do tempo de vida e também a mudanças estruturais de cromatina (IMAI, S.; GUARENTE, L., 2016).

Não é novidade que o estado nutricional de um indivíduo está diretamente relacionado com sua saúde (MALMROS, H., 1950). Entre todas as condições presentes no ambiente de um organismo, o estado nutricional sem dúvida influencia todos os seus aspectos fisiológicos, não sendo diferente com relação às funções cognitivas (GÓMEZ-PINILLA, F. 2008). Estudos anteriores sugerem o papel de nutrientes como ácido fólico e vitamina B12, isoladamente ou em combinação, na prevenção ou redução do declínio cognitivo em idosos (MALOUF, R., EVANS, J. G., 2008). Além disso, encontra-se disponível comercialmente uma combinação de nutrientes contendo óleo de peixe, ômega 3, colina, fosfolípídeos, uridina, vitaminas E, C e do complexo B, ácido fólico, zinco e selênio, que fornece antioxidantes, cofatores e precursores na construção de membranas neuronais e sinapses capazes de provocar melhora significativa nas funções cognitivas em pacientes com Alzheimer brando (SCHELTENS, P. et al., 2010, 2012).

Nesse contexto, o presente trabalho visou experimentar uma dieta suplementada, assim como fizeram Koivisto e colaboradores (2014) com camundongos portadores de Alzheimer. De forma diferente, neste trabalho, a suplementação alimentar foi testada em camundongos idosos e adultos maduros não portadores de Alzheimer.

O uso de animais se justifica pela necessidade da realização de eutanásia para extração de material biológico (encéfalos) para as análises estruturais de cromatina em núcleos de células nervosas e para as análises de parâmetros de estresse oxidativo.

Tendo em vista a prevalência das doenças cognitivas no envelhecimento, as dificuldades enfrentadas pelos indivíduos portadores e suas famílias, e a influência da

alimentação em nível molecular e fisiológico, a elucidação sobre os efeitos de uma suplementação nutricional neste contexto se faz fundamental para o desenvolvimento de intervenções no sentido de retardar ou minimizar o declínio cognitivo no envelhecimento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O núcleo celular, a estrutura da cromatina, e como esta pode ser remodelada.

Quando se observa ao microscópio de luz um corte de tecido corado por hematoxilina e eosina, por exemplo, é muito comum encontrar uma estrutura proeminente dentro de cada célula chamada de núcleo. Esta estrutura se cora bastante por corantes básicos, e seu formato normalmente acompanha o formato e o estado de atividade da célula que a contém (CHEN, B. et al, 2015). O formato do núcleo é geralmente elíptico, porém, pode estar mais compactado e em forma de bastão ou saca-rolhas em algumas células, como as fibras musculares lisas, ou os núcleos bi/trilobulados de polimorfonucleares, ou ainda algumas células que possuem mais de um núcleo, como os cardiomiócitos (ROSS, M. H., 2012). Com estes poucos exemplos, pode-se concluir que não se pode generalizar em relação à morfologia do núcleo celular.

O núcleo contém quase todo o DNA de uma célula eucariótica, e ocupa, em média, cerca de 10% do volume celular total. Em microscopia eletrônica, é possível observar que esse compartimento é delimitado por um envelope nuclear formado por duas membranas concêntricas de bicamada lipídica. Essas membranas contêm grandes poros nucleares que transportam moléculas entre o núcleo e o citoplasma. O envelope nuclear está diretamente ligado à extensa membrana do retículo endoplasmático, que se estende do núcleo ao citoplasma (YAMASU, K; SENSIN, T., 1990).

O núcleo é sustentado mecanicamente por uma rede de filamentos intermediários (as lamínas). Essa rede é chamada de lâmina nuclear e forma uma fina camada internamente ao núcleo, logo abaixo da membrana nuclear interna. O envelope nuclear permite que muitas proteínas atuantes no DNA sejam concentradas onde são necessárias, mantendo as enzimas nucleares separadas das enzimas citoplasmáticas, uma característica crucial para o funcionamento adequado das células eucarióticas: a compartimentalização das reações bioquímicas (ALBERTS et al, 2010).

O DNA interage com proteínas nucleares, em especial as histonas, com as quais faz ligações de hidrogênio e pontes salinas. Ao conjunto do DNA associado a essas proteínas se dá o nome de cromatina (KORNBERG, R. D., 1974). As histonas são proteínas de caráter básico, com alto conteúdo de argininas e lisinas, aminoácidos que contribuem para a interação ácido-base entre o DNA (ácido desoxirribonucleico) e as histonas. Mas, na realidade, a principal forma de interação DNA-histonas se dá pelas ligações de hidrogênio entre as bases

nitrogenadas do DNA e as argininas. As moléculas de água (ambiente aquoso do núcleo) contribuem para essa interação DNA-histonas (ALFERT M.; GESCHWIND, I. I., 1953).

Juntas, duas cópias de cada histona (H2A, H2B, H3 e H4) formam uma unidade proteica central de organização da cromatina, o octâmero de histonas, o qual é circundado por 147 pares de bases de DNA que dá mais de uma volta e meia (1,75 volta) ao redor do octâmero, sendo tal estrutura denominada nucleossomo (SEXTON T, et al, 2007). Centenas de milhares de nucleossomos (conectados entre si por DNA de ligação de 10 a 60 pares de bases) formam as fibras de 10 nm, que lembram a estrutura de um colar de pérolas. No entanto, a cromatina não está sempre na forma da fibra de 10 nm; há também a fibra de 30 nm, estrutura considerada eucromática ainda (YAMASU, K; SENSHN, T. 1990).

Quando se fala de alterações estruturais de cromatina, fala-se necessariamente também de epigenética, mesmo que indiretamente. O significado da palavra epigenética é ligado ao seu prefixo “epi”, que significa “acima”, refletindo o estudo de algo que está “acima da genética” (HOLLIDAY, R., 2006). Isso quer dizer que a epigenética não estuda as alterações na sequência de pares de bases do DNA, mas as alterações que vão além da sequência gênica, incluindo: modificações de histonas; metilação do DNA; e atuação de RNAs não codificantes, que são os RNAs de interferência (EGGER, G. et al., 2004.).

Todas as histonas podem ser modificadas, principalmente nos domínios amino-terminais. Essas modificações pós-traducionais (PTMs) não ocorrem necessariamente ao mesmo tempo, e não necessariamente têm funções agonistas – elas podem estar relacionadas com ativação e/ou inativação de expressão gênica (BANNISTER, A. J, 2011).

Entre estas modificações estão: metilação (mono-, di- e tri-) dos aminoácidos lisina (K) e arginina (R); acetilação (K); fosforilação (serina – S - e treonina -T); ubiquitinação (K) (WANG, H. et al, 2001); e glicosilação (N-acetil-glicosamina - açúcar depositado nas histonas canônicas); além disso, há outras modificações menos expressivas já registradas, como a citrulinação, sumoilação e N-formil-lisina (JENUWEIN, T. et al, 2001).

As PTMs podem ser importantes para as interações específicas entre as variantes de histonas e seus locais específicos funcionais. Mas as PTMs em caudas de histonas por si só não provocam efeito algum (BERGER, S. L; 2007). Essas PTMs são adicionadas nas caudas das histonas por uma classe de moléculas chamada de *writers* (ou “escritoras”), como se escrevessem um código, um sinal, ou uma mensagem sobre as caudas de histonas (BRENNER, C.; FUKS, F., 2007). São necessárias moléculas capazes de reconhecer e fazer a leitura dessa “mensagem”. Para isso, existem as *readers* (ou “leitoras”) – reconhecem essas modificações e executam alguma ação de acordo com a “mensagem” lida. Essas modificações

são reversíveis pela ação de *erasers* (ou “borrachas”) (GARDNER, K. E.; et al, 2011; SETO, E.; YOSHIDA, M., 2014).

Sabe-se que a intervenção nutricional é capaz de modular mecanismos epigenéticos, levando a alterações estruturais em genes específicos e controlando sua expressão (WOLFF, G. L. et al, 1998).

2.2 Senescência celular, estresse oxidativo e remodelação da cromatina no envelhecimento do sistema nervoso.

O termo senescência celular se refere ao estado em que o ciclo celular cessa de forma permanente, com várias alterações celulares morfológicas e de expressão gênica, mantendo-se a célula, porém, em um estado metabolicamente ativo (LIMKE, T. L.; RAO, M. S. 2002). Este fenômeno pode se instalar em decorrência de lesões no DNA, por exemplo, entre outras muitas causas, como encurtamento crítico de telômeros após extensa divisão celular, ou ativação de certos oncogenes (AIRD, K. M.; ZHANG, R., 2013).

Segundo a teoria dos radicais livres sobre envelhecimento biológico (GERSCHMAN, R. et al., 1954; HARMAN, D. 1956), o superóxido e outros radicais livres causam danos aos componentes macromoleculares da célula, dando origem a danos acumulados que acarretam em prejuízo no funcionamento de células, e órgãos, levando ao envelhecimento e, eventualmente, à morte do organismo. O corpo possui alguns antioxidantes naturais na forma de enzimas, que ajudam a conter a acumulação perigosa destes radicais livres, sem os quais as taxas de mortalidade celular seriam muito aumentadas, e, subsequentemente, a expectativa de vida iria diminuir (CADET, J.; DAVIES, K. J. A., 2017). Esta teoria foi reforçada por experiências em que os roedores alimentados com antioxidantes alcançaram maior longevidade média (SHIMOKAWA, I.; TRINDADE, L. S., 2010.).

Outro potencial desencadeador da senescência celular consiste em alterações na estrutura da cromatina, fato que é reconhecido, em células humanas, pela presença de um acúmulo de domínios especializados de heterocromatina facultativa denominados Focos de Heterocromatina Associados à Senescência (SAHF, sigla do inglês: *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*), que provavelmente reprimem a expressão de genes promotores da proliferação, contribuindo, assim, para a suspensão da proliferação celular associada à senescência (ADAMS, P. D., 2007). Muitas vezes, os SAHF possuem algumas modificações de histonas (por exemplo, a metilação na histona H3 da lisina 9) e proteínas associadas à heterocromatina (como a proteína HP1 α) (CAMPISI, J., 2000).

Sabe-se que os níveis de proteína histona são diminuídos no envelhecimento, o que afeta dramaticamente a estrutura cromatínica (FESER, J.; TYLER, J., 2011). Em um estudo usando a enzima nuclease microcócica como sonda para a estrutura da cromatina, verificou-se que o DNA de neurônios e células da glia no córtex e cerebelo de animais mostrou uma susceptibilidade diminuída à digestão durante o envelhecimento. Além disso, ambas as populações neuronais (cerebelar e cerebral) mostraram aumentos dramáticos no espaçamento dos nucleossomos, enquanto a cromatina neuroglial não mostrou nenhuma alteração na acessibilidade à nuclease microcócica (BERKOWITZ, E. M., SANBORN, A. C., VAUGHAN, D. W., 1983), resultados que foram corroborados pelos estudos de Rodrigues e colaboradores (2014). Nesse contexto, é observado aumento da instabilidade genômica, cujas causas e consequências permanecem obscuras, mas dado que a estrutura da cromatina tem influência sobre todo o funcionamento celular, suas potenciais alterações durante o envelhecimento provavelmente desempenham um papel importante (VILLEPONTEAU, B., 1997; BUSUTTIL, R.; BAHAR, R.; VIJG, J. 2007).

De fato, já foi sugerido que as mudanças na estrutura da cromatina possam explicar parcialmente as mudanças nas funções celulares e o aumento da incidência de doenças com a idade (OBERDOERFFER, P.; SINCLAIR, D. A., 2007). Inclusive, é registrado que o tempo de vida em animais pode ser prolongado através de manipulações de moléculas envolvidas na remodelação da estrutura cromatínica, indicando o papel fundamental que esta estrutura desempenha durante o envelhecimento (GUARANTE, L. 2000).

A complexidade e sutileza dos processos de sinapses durante o desenvolvimento humano formam o substrato para atividades superiores como aprendizado, memória, percepção e cognição, e são altamente dependentes de uma rede neuronal bem estruturada e saudável (WHALLEY, L. J. et al, 2004). Mas também importam, igualmente, as células gliais, as quais, nas últimas décadas, têm sido posicionadas mais no palco do que nos bastidores quando o assunto é transferência de informação neural, pois participam ativamente na modulação das sinapses (ARAQUE, A. et al, 1999; GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L., 2013).

Neste contexto, saliente-se que os circuitos hipocampais e neocortical, mediadores das funções cognitivas, são altamente vulneráveis ao envelhecimento, sendo demonstrada vulnerabilidade dos mesmos circuitos tanto no Alzheimer quanto na deficiência cognitiva associada à idade (DAMASCENO, B. P., 1999). No entanto, a morte neuronal predomina na primeira, enquanto a última, pelo contrário, é provavelmente mediada por alterações sinápticas em circuitos intactos (HOF, P. R.; MORRISON, J. H., 2004).

Observa-se, de fato, uma atrofia em cérebros idosos, afetando tanto a substância cinzenta como a branca, que resulta de uma perda de neurônios e axônios mielinizados (WHITEHOUSE, P. J., et al, 1982). Por outro lado, as células microgliais parecem aumentar em número, o que pode ser interpretado como neuroinflamação relacionada ao envelhecimento; mas é geralmente difícil mostrar uma correlação direta entre a ativação microglial ostensiva e a neurodegeneração (TERRY, R. D.; DETERESA, R.; HANSEN, L. A. 1987).

Existem evidências clínicas e experimentais significativas de que a inflamação no sistema nervoso central aumenta com a idade, sendo uma característica do envelhecimento cerebral o aumento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica (NORDEN, D. M.; GODBOU, J. P. 2013). As sinapses nervosas podem ficar mais lentas, e os resíduos do metabolismo podem acumular no tecido cerebral à medida que as células nervosas morrem (YANKNER, B. S.; LU, T.; LOERCH, P., 2008). Isso pode causar anomalias no cérebro, como, por exemplo, a formação de placas e emaranhados proteicos, ou acúmulo de um pigmento lipídico marrom (lipofucsina) no tecido nervoso (KELLER, J. N., et al., 2004). Embora os emaranhados neurofibrilares sejam típicos achados em cérebros com doença de Alzheimer, sabe-se atualmente que também são comuns nos cérebros de indivíduos idosos sem essa doença, geralmente em menor grau (BISHOP, N. A., LU, T.; YANKNER, B. A., 2010).

Relativamente pouco se sabe sobre os efeitos do envelhecimento nos gliócitos, mas estes também podem estar sujeitos ao envelhecimento e à deterioração da função celular, sugerindo que a neurodegeneração possa ser secundária à degeneração glial (CONDE, J. R.; STREIT, W. J., 2006). Assim, os neurônios, que são normalmente dependentes de células gliais viáveis e totalmente funcionais, podem ser afetados negativamente pela deterioração de sua função, o que pode contribuir para o desenvolvimento da degeneração neurofibrilar no cérebro envelhecido através da supressão do suporte glial e da neuroproteção (STREIT, W. J., 2005).

2.3 Envelhecimento, declínio cognitivo, e aspectos nutricionais.

Com o envelhecimento, o declínio da memória humana reflete, em parte, um comprometimento dos processos de memória executiva suportados pelas regiões do lobo frontal do cérebro, combinado com uma deterioração das capacidades de memória explícitas suportadas pelo sistema hipocampal (SQUIRE, L. R.; KNOWLTON B.; MUSEN, G., 1993). Entretanto, a memória não reflete a função de apenas algumas regiões cerebrais específicas,

tendo sido já demonstrado que a memória normal envolve a operação global de múltiplos sistemas cerebrais interdependentes e dissociáveis que dão base a diferentes aspectos da memória e do aprendizado (GABRIELI, J. D. 1993).

Nesse quadro, a desaceleração da memória e do pensamento é uma consequência comum, que, porém, não acontece da mesma forma para todos que envelhecem: algumas pessoas apresentam grandes mudanças em nervos e também tecidos cerebrais, enquanto em outras pessoas estas alterações se fazem praticamente imperceptíveis (GOLDMAN, J. E. 1994). Sendo assim, o declínio cognitivo é considerado um processo não inevitável (RAPP, P. R., 1994), sugerindo-se, por estudos epidemiológicos e observacionais recentes, uma relação entre os fatores relacionados ao estilo de vida e o declínio da função cognitiva em adultos idosos, apontando-se, mais especificamente, a desnutrição e as deficiências nutricionais como potenciais desencadeadores do declínio cognitivo precoce, e instalação de quadros de demência (OGAWA, S. 2014).

Enquanto os distúrbios neurodegenerativos são caracterizados pela morte extensiva de neurônios, levando ao declínio funcional, os correlatos neurobiológicos do declínio funcional no envelhecimento normal, porém, são bem menos definidos (MORRISON, J. H.; HOF, P. R. 1997). De forma abrangente, parece que os substratos neurobiológicos primários para a deficiência funcional no envelhecimento diferem de formas importantes daqueles em distúrbios neurodegenerativos tais como a doença de Alzheimer (DICKERSON, B. C. et al. 2005).

O declínio cognitivo diz respeito a alterações relacionadas à inteligência, na forma de processamento de informações pelo cérebro, envolvendo principalmente funções mentais como memória, raciocínio lógico e abstrato, linguagem, atenção, percepção, e capacidades executivas (LEVY, R. 1994). Nesse contexto, a síndrome conhecida como comprometimento cognitivo leve (CCL) representa um declínio cognitivo maior do que o esperado para a idade e nível educacional de um indivíduo, mas sem prejudicar notavelmente suas atividades cotidianas (GAUTHIER, S. et al, 2006). Algumas pessoas com CCL parecem permanecer estáveis ou retornar ao normal com o tempo, porém, mais da metade progride para a demência dentro de cinco anos, sendo o CCL, portanto, considerado o principal fator de risco para a demência (BRUCKI, S. M. D., 2013).

A prevalência de CCL no Brasil apresenta taxa de 6,1% e incidência de 13,2/1000 pessoas-ano, entre aqueles de 60 anos ou mais (GODINHO, C. et al, 2012), encontrando-se dentro das faixas observadas em outros países, que estão entre 3 a 19% (RITCHIE, K., 2004; BRUCKI, S. M. D. 2013). O subtipo amnésico de CCL representa alto fator de risco para a

doença de Alzheimer, podendo constituir um estágio precoce da mesma (BOYLE, P. A., et al. 2006).

Nas últimas décadas, alguns resultados de pesquisas têm indicado como fator de risco para o CCL a deficiência nutricional subclínica de antioxidantes como as vitaminas C, E, e betacaroteno, vitamina B12, vitamina B6, e folato, além de condições como hipercolesterolemia, hipertriacilglicerolemia, hipertensão, e diabetes, os quais podem se cronificar antes do aparecimento de evidências demenciais (GONZÁLEZ-GROSS, M., MARCOS A., PIETRZIK K., 2001).

Fatores dietéticos exercem seus efeitos no cérebro através de eventos moleculares relacionados com o gerenciamento do metabolismo energético e da plasticidade sináptica: o metabolismo energético influencia as funções e sinalizações neuronais, a plasticidade sináptica, e, por fim, a saúde mental; a regulação epigenética da plasticidade neuronal aparece como um mecanismo importante pelo qual os alimentos podem exercer seus efeitos na plasticidade neuronal em longo-prazo (GOMEZ-PINILLA, F., TYAGI, E., 2013).

Uma das principais causas potenciais de destruição do tecido neuronal relacionada à idade é a presença de radicais livres tóxicos (EROS, ou espécies reativas de oxigênio), que são resultado natural do metabolismo aeróbio (JIN, K., 2010). Danos oxidativos causados por radicais livres *in vivo* têm sido responsabilizados pela ocorrência de processos biológicos tais como mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C., 1989). As espécies derivadas de oxigênio, tais como o radical superóxido (O_2^-) e H_2O_2 , são geradas em todas as células aeróbias (DIZDAROGLU, M.; GAJEWSKI, E. 1989). A toxicidade dessas espécies está no radical hidroxil, o qual é altamente reativo, e pode ser formado por reações entre O_2^- e H_2O_2 catalisadas por íons metálicos (HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I., 1991). O radical hidroxil produz uma série de lesões no DNA e nas nucleoproteínas, tais como lesões em bases, em pentoses, quebras de uma única cadeia, quebras de dupla cadeia, sítios abásicos, e reticulações de DNA-proteína por uma variedade de mecanismos (TÉOULE, R.; CADET, J., 1978).

O cérebro é particularmente suscetível a ataques de radicais livres, porque produz mais EROS por grama de tecido do que qualquer outro órgão (CHOI, J.; YU, B. P., 1995). O principal mecanismo de defesa usado pelo cérebro para combater EROS é através do seu metabolismo enzimático, em que atuam os antioxidantes vitamínicos, vitamina E (alfa-tocoferol em particular) e vitamina C (ascorbato) (REITER, R. J., 1995).

Como outro exemplo, estudos *in vivo* com resveratrol, conhecido por seu poder antioxidante, administrado a camundongos alimentados com uma dieta hipercalórica (que

induz prejuízos funcionais semelhantes aos vistos no envelhecimento) demonstraram melhora no estado geral de saúde, verificando-se uma redução importante dos sinais de envelhecimento, com diminuição da inflamação e apoptose no endotélio vascular, aumento da elasticidade da aorta, maior coordenação motora, e densidade mineral óssea preservada. Em camundongos, o resveratrol é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, e proteger contra lesão cerebral, prevenir o declínio cognitivo e promover neuroproteção em geral, demonstrando ser capaz de atenuar sintomas de doenças neurológicas como a doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e esclerose múltipla (SOARES, T. J. C., 2014).

Dessa forma, embora a idade seja, de fato, o preditor mais importante do declínio cognitivo, também atuam de forma crucial os fatores genéticos e ambientais, entre eles, a alimentação se destaca por seu grande impacto sobre as funções celulares, e consequentemente, sobre todo o organismo, principalmente através de alterações na capacidade antioxidante e na organização estrutural da cromatina (BAILEY, R; ARAB, L. 2012). Portanto, estratégias nutricionais para prevenir ou retardar o declínio cognitivo poderiam impactar significativamente na saúde pública, sendo necessário focar na manutenção da função cognitiva em adultos saudáveis, e na prevenção contra maior declínio daqueles que já foram acometidos de perdas cognitivas significativas.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em analisar e comparar o potencial efeito benéfico da suplementação alimentar nas funções cognitivas em camundongos adultos maduros e idosos, quando comparados a camundongos de mesma idade não suplementados, além de avaliar se os efeitos observados estariam associados com alterações estruturais da cromatina e com alterações na capacidade antioxidante de células neuronais e neuroglia.

De forma mais específica, as seguintes questões foram abordadas:

- Camundongos idosos possuem perda cognitiva mensurável se comparados aos animais adultos maduros?
- Camundongos adultos maduros e idosos com alimentação suplementada apresentam alguma melhora cognitiva, quando comparados a animais de mesma idade sem a mesma suplementação alimentar?
- As alterações cognitivas detectadas estariam associadas com reorganização da cromatina nas células analisadas?
- As alterações cognitivas detectadas estariam associadas com alterações na capacidade antioxidante encefálica?

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais com o protocolo de registro CEUA/UFU 072/15 (anexo A). Fêmeas de camundongos C57BL/6 obtidas no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, *campus* Umuarama, foram transferidas para o depósito de camundongos do Setor de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM). Ali, os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com cerca de 6 animais por caixa, com condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), baixo ruído, ciclo claro-escuro de 12 horas, alimento e água *ad libitum*. As gaiolas e bebedouros foram lavados e esterilizados com água sanitária semanalmente, depois da troca de maravalha. A escolha pelas fêmeas deveu-se ao fato de os machos normalmente atacarem seus companheiros de gaiola em lutas por território, havendo necessidade de manutenção de gaiolas individuais, contrariamente às fêmeas que convivem pacificamente na mesma gaiola, possibilitando o uso de um número menor de gaiolas e economia de espaço no depósito, que foi ocupado por tempo maior que o costumeiro, devido à idade dos animais necessária para realização deste trabalho.

Foi utilizado um total de vinte e quatro camundongos, sendo metade composta por adultos maduros (cinco meses = vinte semanas), e a outra metade por idosos (21 meses = 84 semanas). A terminologia utilizada para cada idade foi retirada de <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>. O grupo de animais adultos maduros é de animais que já alcançaram a maturidade reprodutiva e, portanto, de desenvolvimento completo, e são equivalentes a humanos de 20 a 30 anos de idade. O grupo de animais idosos é equivalente a humanos entre 56 e 69 anos de idade. A escolha das idades baseou-se na necessidade de medir características acumuladas com o envelhecimento fisiológico, sem interferência de eventos de desenvolvimento característicos de animais jovens. A linhagem escolhida (C57) possui longevidade média de 28 meses, e é refratária a uma gama de tumores, sendo um dos poucos fenótipos com perda de audição associada à idade (The Jackson Laboratory - <https://www.jax.org/strain/000664>). Consequentemente, trata-se de um bom modelo para estudar envelhecimento sem viés introduzido por outras doenças associadas à idade.

Os animais idosos foram separados aleatoriamente em dois grupos com 6 animais cada; da mesma forma, os animais adultos maduros foram separados aleatoriamente em dois

grupos, também com 6 animais cada. Totalizaram-se, assim, quatro grupos, com seis animais cada, como descrito a seguir:

- Grupo 1, G1, (controle) com camundongos adultos maduros;
- Grupo 2, G2, (controle) com camundongos idosos;
- Grupo 3, G3, (suplementado) com camundongos adultos maduros;
- Grupo 4, G4, (suplementado) com camundongos idosos;

Os animais foram descritos individualmente por letras do alfabeto, por exemplo, animais do grupo G1: G1A, G1B, G1C, etc.; animais do grupo G2: G2A, G2B, G2C, etc.

4.2 Suplementação alimentar

A suplementação alimentar foi realizada para esses animais depois de atingidas as idades desejadas. Os animais dos grupos controle receberam a ração convencional do biotério (CR1 Nuvilab), enquanto os grupos suplementados receberam a mesma ração com adição de uma mistura de nutrientes. Segundo o rótulo da embalagem da ração CR1 Nuvilab, a composição básica dessa ração consiste em milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio. As composições em termos de vitaminas, minerais, aminoácidos (de ambas as rações) se encontram na Tabela 1.

Foram 30 dias de suplementação até os testes comportamentais, que foram realizados posteriormente, sendo que a dieta foi continuada durante e após os testes, totalizando 52 dias de suplementação até o dia da eutanásia.

Tabela 1. Composição comparada das rações controle e suplementada.

Composição	Ração controle	Ração suplementada	
<u>ÁCIDO EICOSAPENTANÓICO (EPA)</u>	<u>0</u>	<u>480</u>	mg/kg
<u>ÁCIDO DOCOSAHEXANÓICO (DHA)</u>	<u>0</u>	<u>1920</u>	mg/kg
<u>FOSFOLIPÍDEOS</u>	<u>0</u>	<u>170</u>	mg/kg
VITAMINA A	25500	25500	UI/kg
VITAMINA D3	2100	2100	UI/kg
<u>VITAMINA E</u>	<u>89,4</u>	<u>153,4</u>	mg/kg
VITAMINA K3	12,5	12,5	mg/kg
VITAMINA B1	14,4	14,4	mg/kg
VITAMINA B2	11	11	mg/kg
<u>VITAMINA B6</u>	<u>12</u>	<u>13,6</u>	mg/kg
<u>VITAMINA C</u>	<u>0</u>	<u>128</u>	mg/kg
NIACINA	60	60	mg/kg
ÁC. PANTOTÊNICO	112	112	mg/kg
<u>ÁCIDO FÓLICO</u>	<u>6</u>	<u>6,64</u>	mg/kg
BIOTINA	0,26	0,26	mg/kg

<u>COLINA</u>	<u>2400</u>	<u>3040</u>	mg/kg
<u>VITAMINA B12</u>	<u>60</u>	<u>64,8</u>	ug/kg
FERRO	50	50	mg/kg
ZINCO	60	60	mg/kg
COBRE	10	10	mg/kg
IODO	2	2	mg/kg
MANGANÊS	60	60	mg/kg
COBALTO	1,5	1,5	mg/kg
SODIO	2700	2700	mg/kg
FLÚOR	80	80	mg/kg
FÓSFORO	8000	8000	mg/kg
<u>SELÊNIO</u>	<u>0</u>	<u>96</u>	ug/kg
DL-METIONINA	500	500	mg/kg
LISINA	100	100	g/kg
<u>URIDINA MONOFOSFATO</u>	<u>0</u>	<u>1000</u>	mg/kg
<u>VALOR ENERGÉTICO</u>	<u>3976</u>	<u>3885</u>	kcal/kg

Componentes da suplementação estão sublinhados na tabela.

Os nutrientes adicionados à ração suplementada foram obtidos a partir de uma fórmula nutricional denominada *Fortasyn Connect*, disponível comercialmente como ingrediente da bebida Souvenaid[®], comercializada no Brasil pela Danone Nutrição Especializada.

Segundo o rótulo, disponível em <http://souvenaid.com.br/>:

“Souvenaid é um composto nutricional com mais de 10 anos de pesquisa e desenvolvimento que contém uma combinação exclusiva de ácidos graxos EPA e DHA (ômega3), Uridina monofosfato (UMP), colina, fosfolipídios, vitaminas do complexo B e micronutrientes antioxidantes.”

O *Fortasyn Connect* se destina ao aumento da formação e função das sinapses nervosas na DA. A fórmula da Danone é uma bebida tipo láctea não fermentada, de consistência líquida, com cerca de 90% de água, como o leite (ALVES, E. C.; BORGES, A. F., 2016). Para sua adição na ração dos grupos suplementados, a bebida foi primeiramente congelada (- 20 °C) e liofilizada em liofilizador Liotop L108, com pressão de 1,308 mmHg, e temperatura de - 63 °C, por 5 dias (MATOS, C. M. S. et al., 2015; MOGHBELA, A; ABBASPOURB, H., 2013).

Para atingir a dose de suplementação desejada para os camundongos, como foi feito anteriormente por Koivisto e colaboradores (2014), utilizando a mesma fórmula, foi considerado 1 mL de Souvenaid líquido por dia por camundongo, sabendo que camundongos consomem em média 5 g de ração por dia, cada um. A densidade do Souvenaid é 1,032 g/mL, e após a liofilização, a bebida se torna um pó, cujo volume é reduzido em 85%. Assim, cada 5g de ração suplementada contiveram 0,15 g de Souvenaid em pó (3% em massa). O processo

de liofilização é interessante porque permite a desidratação dos alimentos sem perda de suas propriedades e valor nutricional (FRANKS, F. 1998).

Dessa forma, para confeccionar a ração, semanalmente, foi pesado sempre 0,15 g de Souvenaid em pó para cada 4,85 g de ração CR1 Nuvilab. A ração, depois de pesada, foi triturada em liquidificador convencional, e em seguida, foi adicionada a suplementação em pó, sendo a mistura homogeneizada com auxílio do liquidificador, e depois também manualmente com espátula em recipiente limpo e seco, onde foi acrescentada água de osmose reversa para peletização manual da ração. A ração peletizada foi colocada em recipiente metálico limpo e seco, coberto e protegido com pano limpo e seco, permitindo ventilação, mas impedindo acesso de insetos e outros animais, por três a quatro dias, sendo a ração revirada a cada duas horas durante o período diurno para que a secagem ocorresse por igual.

Com relação ao valor energético, a ração Nuvilab CR1 – Nuvital apresenta 3,976 kcal/g. Após a mistura com o Souvenaid liofilizado (valor energético da bebida da Danone: 0,97 kcal/g), nas proporções apresentadas acima, fazendo uma média ponderada, o valor energético final da mistura é igual a 3,885 kcal/g, o qual se aproxima muito do valor da ração convencional, sendo sutilmente mais baixo:

$$Valor\ energético = \frac{(0,15 \times 0,97) + (4,85 \times 3,976)}{5} = 3,8856\ kcal/g$$

4.3 Testes comportamentais

Depois de 30 dias completos de suplementação alimentar, todos os animais foram submetidos a três testes comportamentais para acessar suas funções cognitivas com relação à memória e aprendizado: o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), a Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO), e o Labirinto Aquático de Morris (LAM). Todos os testes, exceto pelos dias de treinamento, foram filmados para posterior análise, com auxílio do *software* AnyMaze®, versão 4.99.

4.3.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE permite acessar a interação entre aprendizado/memória aversiva e ansiedade (ITO, J.; NABESHIMA, T.; KAMEYAMA, T., 1990; FILE, S. E. 1993). Para tanto, é utilizado um labirinto em formato de cruz, feito de material acrílico, que é elevado do solo por um suporte de madeira de 38, 5 cm, e possui quatro braços. Dois braços são abertos, e cada braço forma uma pista de 30 x 5 cm, com pequenas elevações laterais de 0,25 cm em suas bordas (não protegem o animal contra quedas); os outros dois braços são fechados, com as mesmas dimensões dos braços abertos, exceto pelas bordas que formam paredes protetoras

laterais com 15 cm de altura, cuja abertura se dá apenas no centro da cruz, numa plataforma de 5 x 5 cm que une todos os braços, conforme pode ser observado no apêndice A (seção LCE).

Neste teste, cada animal foi colocado na extremidade de um dos braços abertos (sempre o mesmo braço para todos), com sua face voltada para fora do aparato; imediatamente foi cronometrado o tempo de latência (TL) para que o animal explorasse o aparato, e entrasse em um dos braços fechados (uma entrada efetiva é considerada quando as quatro patas do animal estão dentro do braço fechado).

Este teste foi feito em dois dias, da mesma forma descrita acima, sendo anotados os tempos de latências TL1 (dia 1 – treinamento), e TL2 (dia 2 – desafio). Espera-se que, no segundo dia, o animal leve menos tempo para acessar um dos braços fechados, indicando aprendizado.

É dado a todos os animais um tempo máximo de 10 minutos para explorar o aparato, encontrar e adentrar um braço fechado, mas a maioria costuma ser capaz de fazer isso em pouquíssimo tempo. Mas, há casos em que o animal não realiza o objetivo da tarefa dentro dos 10 minutos estipulados, e então, o protocolo consiste em conduzir o animal e mostrar a entrada dos braços fechados para que este aprenda sua localização, mas apenas na primeira vez que o animal tem contato com o aparato, pois o primeiro dia é considerado o treinamento.

Entre cada troca de animal, o aparato foi limpo com álcool 15% (que limpa de forma suficiente para o teste, sem provocar alteração de odor).

Este teste comportamental é clássico para avaliação de ansiedade, porém, com este protocolo de utilização, é possível acessar o desempenho de aprendizado e memória aversiva do animal, em que a sua tendência natural é procurar o local mais seguro, que são os braços fechados (SHARMA, A. C.; KULKARNI; S. K., 1992).

4.3.2 Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO)

A TRO explora a preferência inata dos roedores pela novidade, sendo este teste inerentemente não estressante (VOGEL-CIERNIA, A.; WOOD, M. A., 2014).

Neste teste, cada animal foi colocado em uma caixa retangular de cor branca opaca com uma linha divisória no assoalho da caixa. Em uma extremidade da caixa são colocados dois objetos idênticos em um primeiro momento, e depois um dos objetos é trocado por um objeto diferente, sendo que os objetos se posicionam um de cada lado da linha divisória (apêndice A – seção TRO).

Este teste foi realizado em dois dias. No primeiro dia, cada animal passou 15 minutos dentro da caixa com os dois objetos idênticos para conhecê-los, ou seja, para se familiarizar com ambos os objetos e o ambiente da caixa em si. Entre cada troca de animal a caixa foi limpa com álcool 15%. No segundo dia, cada animal foi colocado na caixa em dois momentos:

1ª exposição: cada animal passou 10 minutos dentro da caixa com os dois objetos idênticos, para reconhecê-los.

2ª exposição: Uma hora após a primeira exposição, cada animal foi colocado novamente na caixa, mas desta vez, um dos objetos já conhecidos pelo animal fora trocado por um objeto novo e diferente.

Em ambas as exposições, os vídeos feitos foram examinados para cronometrar o tempo em que cada animal passou em contato com os dois objetos idênticos, e depois, com o objeto novo em detrimento do objeto conhecido.

Este método avalia a memória explícita em roedores (ENNACEUR e DELACOUR 1988), e se baseia em sua tendência natural de exploração do ambiente e objetos novos, a fim de conhecê-los. Assim, tendo explorado os objetos idênticos em dois momentos, em dois dias consecutivos, a presença de um objeto diferente na mesma caixa conhecida, junto a um objeto conhecido, deve fazer com que o animal passe mais tempo explorando o objeto novo em detrimento do objeto conhecido. Portanto, quanto menor o tempo em que o animal passa em contato com o objeto conhecido, ou quanto maior o tempo com o objeto novo, então, isto deve significar que o animal reconheceu o objeto dos contatos anteriores.

4.3.3 Labirinto Aquático de Morris (LAM)

No LAM são acessados o aprendizado e a memória espaciais (GALLAGHER, M., 1993; D'HOOGHE, R.; DE DEYN, P. P., 2001). Neste método, utilizou-se um tanque cilíndrico com base de diâmetro igual a 120 cm, contendo água. Dentro desse tanque com água foi colocada uma plataforma cilíndrica de acrílico transparente, com uma base de diâmetro de 20 cm e altura de 30 cm. Além da plataforma, havia também algumas pistas visuais nas paredes do tanque, as quais tinham o propósito de servir como pontos de referência para os animais. O nível da água no tanque era tal de modo que a plataforma (base superior do cilindro) ficasse um centímetro acima da superfície da água, como mostra o esquema do apêndice A (seção LAM).

Para este teste, os animais passaram por 4 dias de treinamento e no quinto dia foram submetidos ao desafio. Nos dias de treinamento, cada animal foi colocado na água, apenas

uma vez por dia, cada dia em um quadrante diferente, mas nunca no mesmo quadrante da plataforma, com a face voltada para a parede do tanque. O cronômetro era disparado quando o animal entrava em contato com a água. Cada animal nadou pelo tanque até que encontrasse a plataforma e subisse na mesma. Apenas quando o animal colocasse as 4 patas sobre a plataforma o cronômetro era parado. A cada animal foi dado um tempo máximo de 2 minutos para encontrar e subir na plataforma. Quando isso não acontecia dentro dos 2 minutos, o protocolo consistia em conduzir o animal até a plataforma (apenas nos dias de treinamento). A retirada do animal do tanque ocorreu apenas após trinta segundos de permanência sobre a plataforma.

No dia do desafio, a plataforma foi retirada. Posteriormente foi contabilizado, através dos vídeos, o tempo em que o animal permaneceu dentro do quadrante de interesse (onde havia a plataforma nos dias de treinamento). Quanto maior esse tempo, maior teria sido o aprendizado do animal com relação à localização da plataforma. Foi considerada também a latência ou rapidez com que o animal teria o primeiro contato com o local onde havia a plataforma nos dias de treinamento, sendo desejável uma latência menor para que se considerasse o aprendizado.

4.4 Coleta de material biológico:

Após os testes cognitivos, os camundongos foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical. Os encéfalos inteiros foram dissecados, fatiados e congelados a -20°C para as análises posteriores.

4.5 Isolamento de neurônios e gliócitos

Para o isolamento das células, após o descongelamento, os fragmentos de encéfalo (obtidos pelo fatiamento do encéfalo inteiro, conforme item 4.4) de cada animal foram homogeneizados em 3 mL tampão sacarose (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, PMSF 0,25 mM, sacarose 250 mM, e $MgCl_2$ 1 mM), utilizando-se um homogeneizador do tipo Potter manual. Em seguida, o material homogeneizado foi filtrado em uma camada de musselina, e acrescido de 3 mL do mesmo tampão. Essa suspensão foi submetida à centrifugação (10 minutos a 600 x g a 4 ° C), depois da qual foi aspirado o sobrenadante para análises bioquímicas. O sedimento resultante da centrifugação (precipitado celular) foi novamente ressuspenso para 2 mL de solução com tampão sacarose, homogeneizado e separado em duas alíquotas de 1 mL cada, as quais foram congeladas com adição de DMSO (10%), para uso posterior (PEARSON et al, 1983; THOMPSON, 1973).

4.6 Citoquímica e análise de imagens

Para análise de parâmetros morfométricos nucleares e avaliação da organização cromatínica, foram confeccionadas lâminas histológicas com suspensão de células totais isoladas das amostras biológicas dos encéfalos de cada camundongo individualmente, sendo as mesmas fixadas por 1 minuto em etanol/ácido acético glacial 3:1 (v/v), e, em seguida, banhadas em etanol 70% por 5 minutos.

As lâminas fixadas foram submetidas à Reação de Feulgen (SCHULTE, E., WITTEKIND, D., 1989; RODRIGUES, H. F., et al., 2014): hidrólise ácida (HCl 4M) à temperatura de 24-25 °C por 55 min.; em seguida as lâminas foram enxaguadas com solução ácida (HCl 0,1M) gelada (temperatura de geladeira); reagente de Schiff foi pingado sobre as lâminas, onde permaneceu sobre as mesmas em câmara úmida e escura por no mínimo 45 minutos; depois, as lâminas passaram por 3 banhos de 5 minutos cada em água sulfurosa (1 parte de HCl 1M, 1 parte de metabissulfito de sódio 10%, e 18 partes de água); as lâminas foram protegidas da luz para evitar oxidação precoce da coloração.

Após a coloração, as lâminas foram secas e montadas em bálsamo do Canadá. Fotomicrografias dos núcleos de neurônios e gliócitos corados foram capturadas em microscópio Leica DM500, equipado com câmera digital Leica ICC50HD conectada a um microcomputador, e utilizando o *software* de captura Leica LAS EZ (versão 1.8.1), sendo as mesmas condições de iluminação e configurações de captura para todas as amostras, a saber: intensidade de luz mantida sempre no máximo, e o diafragma da condensadora na posição 100x; no *software* de captura, o tempo de exposição 6,8 ms, ganho de 1,9x, gamma 2,00, e saturação 63,00. As imagens assim obtidas tiveram uma escala correspondente a 16 pixels/ μm , e foram analisadas através do *software* ImageJ, onde se obtiveram as seguintes informações sobre os núcleos: área nuclear (μm^2); média dos níveis de cinza por núcleo, convertida em valores de absorbância ou densidade óptica (OD), a qual reflete o grau de compactação da cromatina; e densidade óptica integrada (IOD), a qual representa a quantidade de DNA, pois a reação de Feulgen é uma reação estequiométrica (DEITCH, A. D.; WAGNER, D.; RICHART, R. M. 1968).

Para a análise de imagens, foram selecionados aleatoriamente no mínimo 100 núcleos de cada animal, sendo cerca de 550 a 750 núcleos avaliados para cada um dos grupos. Os núcleos foram selecionados a partir das imagens capturadas parcialmente de forma manual (ferramenta de seleção manual), por causa de alguns neurônios muito claros em relação ao fundo, e parcialmente de forma automatizada, com a ferramenta *threshold*, que é capaz de

separar os núcleos do fundo da imagem com base em um limiar de intensidade de níveis de cinza.

A conversão dos níveis de cinza em absorbância foi feita com uso da barra de calibração número 3 da Kodak (instruções disponíveis em <https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>), aplicando-se a ferramenta do *software* ImageJ “Optical Density Calibration”.

Os demais parâmetros avaliados foram contraste e entropia, os quais refletem a textura dos núcleos com base em matrizes de correlação de escala de cinza (GLCM) (HARALICK, R. M.; SHANMUGAM, K.; DINSTEN, I., 1973; PANTIC, I. et al. 2012). Mais especificamente, os valores de contraste representam a variação da compactação da cromatina por núcleo, e assim, um valor de contraste maior significa uma maior variação do estado de compactação entre áreas nucleares diferentes, ou seja, com maior diferença entre áreas de menor compactação e áreas de maior compactação da cromatina. Os valores de entropia, por sua vez, são medidas de desordem e representam a quantidade de informação em bits necessária para armazenar as informações de cada núcleo. Núcleos com menor entropia tendem a mostrar uma morfologia mais homogênea, enquanto os núcleos mais entrópicos são aqueles com maior quantidade de regiões mais e menos compactas na mesma estrutura, apresentando aspecto mais heterogêneo.

4.7 Análise de marcadores de estresse oxidativo

O sobrenadante resultante da purificação de núcleos (item 4.5 acima), foi centrifugado a 800xg 10 min. e teve sua quantidade de proteína total dosada pelo método de Bradford (BRADFORD, M. M. 1976).

O nível de peroxidação lipídica (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) foi medido nos sobrenadantes de encéfalo reagindo malondialdeído (MDA) da amostra com ácido tiobarbitúrico (TBA 0,75%). A peroxidação lipídica é um processo pelo qual radicais livres reagem com lipídeos de membrana, originando o MDA. Quando aquecido na presença do TBA ocorre formação de um composto de coloração rosada, lido espectrofotometricamente à 532 nm (YAGI, K. 1998). Tanto a fase orgânica como os brancos das amostras foram avaliados em um espectrofotômetro em dois comprimentos de onda, 532 e 600 nm. Em decorrência do coeficiente de extinção molar do MDA foi possível a quantificação do TBARS nas amostras (BUEGE, J. A.; AUST, S. D., 1978).

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada com base no método de Griess (GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R., 1996). Para tanto, mediu-se o

nível total de nitrito (NO_2^-) combinando quantidades iguais de sulfanilamida 1% e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1% em ácido fosfórico 2,5% como diluente para criar o reagente de Griess, do qual foram aplicados 50 μl sobre 50 μl de amostra em placas de 96 poços. A absorbância foi medida a 450 nm num leitor de microplacas (SoftMax, Molecular Devices).

Os níveis totais de sulfidrina (tiol) foram determinados utilizando 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzólico), conhecido pela sigla DTNB, ou reagente de Ellman, como descrito em Faure e Lafond (1995). O DTNB, adicionado é reduzido pelos tióis presentes na amostra, gerando um derivado amarelo, o qual pode ser determinado à 412 nm (AKSENOV, M. Y., MARKESBERRY, W. R., 2001).

4.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada nos *softwares* Minitab™ 14 ou GraphPad Prism 6. Os testes estatísticos adequados foram determinados após análise da distribuição dos dados com o teste de normalidade de Anderson-Darling. Foram aplicados os testes ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey ou teste t-não pareado para distribuições gaussianas ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn para distribuições não gaussianas.

5. RESULTADOS

5.1 O envelhecimento em camundongos afeta negativamente o desempenho em memória/aprendizado em alguns testes comportamentais, e a suplementação reverte os efeitos.

5.1.1 Massa corporal dos animais após dieta

A massa corporal dos animais foi verificada antes do início da suplementação, no 30º dia da suplementação (e antes dos testes comportamentais), e após o término dos testes comportamentais, no dia da eutanásia (52º dia da suplementação). Os dados (Tabela 2 e Gráfico 1) mostram que não houve alterações significativas de massa corporal ao longo dos experimentos para qualquer grupo, nem diferenças decorrentes da administração da dieta suplementada, o que é de se esperar dado que as duas dietas utilizadas são praticamente isocalóricas. Também como esperado, há uma clara diferença de massa corporal entre animais adultos e animais idosos, já que camundongos ganham massa corporal conforme se desenvolvem e posteriormente envelhecem (JEON, J. Y. et al., 2006).

Tabela 2. Massa corporal dos animais antes e depois da suplementação.

Grupos		Massa corporal dos animais		
		ANTES da suplementação	Antes dos testes cognitivos	Após os testes cognitivos
G1	A	21.05	22.8	22.5
	B	22.6	23.6	23.8
	C	21.6	23.5	23.9
	D	21.8	21.3	24.1
	E	21.9	21.3	23.5
	F	12.5	11.07	11.3
G2	A	30.8	28.5	28.2
	B	30.99	32.6	29.5
	C	29.7	30.9	34.3
	D	29.45	27.6	33.7
	E	30.11	30	31.4
	F	*	*	*
G3	A	21.2	22.8	23.9
	B	21.1	20.8	22.4
	C	20.99	20.9	20.5
	D	20.97	21.5	22.22
	E	19.7	21.9	22.6
	F	20.2	20.3	23
G4	A	29.18	33.6	30.5
	B	28.28	28.4	25.9
	C	31.3	34.4	28.4
	D	26.84	28.4	34.5
	E	31.45	29.9	26.6
	F	27.22	27.7	*

* representa medidas ausentes, por motivo de morte dos animais correspondentes.

G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

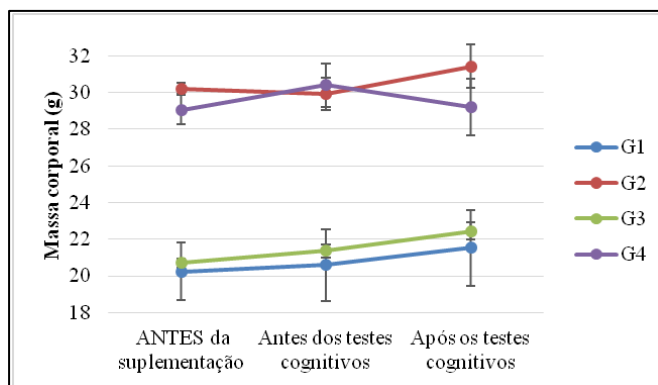


Gráfico 1. Variações de massa corporal nos diferentes grupos, antes, durante, e após aplicação dos testes cognitivos.

A única diferença observada, e esperada, decorre da diferença de massa existente em animais de diferentes idades. Valores expressos em médias e erro padrão da média.

G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

Outra observação importante nesses dados refere-se ao animal G1F, que apresentou, em todas as avaliações, valores de massa corpórea quase 50% inferiores aos dos demais animais do mesmo grupo, o que pode indicar alguma condição patológica. Interessantemente, esse animal foi justamente um adulto *nonperformer* em dois dos três testes cognitivos realizados.

5.1.2 Labirinto em Cruz Elevado

No LCE, todos os animais, à exceção de G1A, G1F, G2D, G2F, e G3A, apresentaram $TL2 < TL1$, indicando bom desempenho memória/aprendizado no LCE (Tabela 3). Saliente-se que isso mostra que, ao contrário dos demais grupos, todos os integrantes do grupo idoso suplementado apresentaram $TL2 < TL1$. G1A e G3A, animais jovens, surpreendentemente apresentaram evidência de ausência de aprendizado. G1F e G2D apresentaram comportamento aversivo no braço aberto onde foram colocados (ficaram imóveis), mostrando que o teste não conseguiu abordar apenas comportamento de memória/aprendizado, mas foi contaminado com a aversividade inerente ao mesmo. Como visto na Tabela 2, G1F é o animal com massa corpórea abaixo da média, e por isso foi excluído de todas as análises comportamentais. G2F morreu antes dos testes com idade avançada.

Como os tempos de latência entre diferentes animais dentro do mesmo grupo são bastante heterogêneos, optou-se por medir a razão $TL1/TL2$ como uma forma de comparar a eficiência no desempenho de memória/aprendizado no LCE. Os dados por grupo podem ser vistos no Gráfico 2, onde foram excluídos da análise o animal G1F (baixo peso) e G2D (permaneceu imóvel no aparato nos dois dias de teste) (ver Tabela 3), e permitem concluir

que o envelhecimento não pareceu estar associado com prejuízos de memória nos camundongos neste teste. Contrariamente, há inclusive uma tendência discreta, mas não estatisticamente significativa, ao melhor desempenho nos idosos não suplementados com relação aos adultos maduros. Entretanto, conclui-se que a suplementação da alimentação dos animais idosos tornou o comportamento de memória/aprendizado com aversividade muito mais eficiente neste aparato, pelo menos com relação aos animais adultos maduros, suplementados ou não.

Tabela 3. Resultados de tempos de latência e razão TL1/TL2 no LCE de todos os grupos.

Labirinto em Cruz Elevada			
Grupos	Latência - tempo (s)		
G1	1º dia (TL1 - aprendizado)	2º dia (TL2 - memória)	Razão TL1/TL2
G1A	40.7	45.21	0.900243309
G1B	95.67	24.48	3.908088235
G1C	48.7	24.08	2.022425249
G1D	63.68	32.99	1.930281904
G1E	53.15	8.76	6.067351598
<u>G1F</u>	<u>600</u>	<u>600</u>	<u>1</u>
G2			
G2A	54.385	19.28	2.820798755
G2B	79.54	23.27	3.418134938
G2C	270.425	72.015	3.755120461
<u>G2D</u>	<u>600</u>	<u>600</u>	<u>1</u>
G2E	178.845	27.555	6.490473598
G3			
G3A	92.58	112.49	0.823006489
G3B	73.24	17.13	4.275539988
G3C	79.69	21.51	3.70478847
G3D	42.05	23.79	1.767549391
G3E	40.84	17.63	2.316505956
G3F	90.7	21.32	4.254221388
G4			
G4A	129.455	13.825	9.363833635
G4B	99	9.295	10.65088757
G4C	365.905	46.065	7.943232389
G4D	51.705	14.575	3.547512864
G4E	89.715	15.94	5.628293601
G4F	600	34.125	17.58241758

Animal excluído da análise destacado em sublinhado.

G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

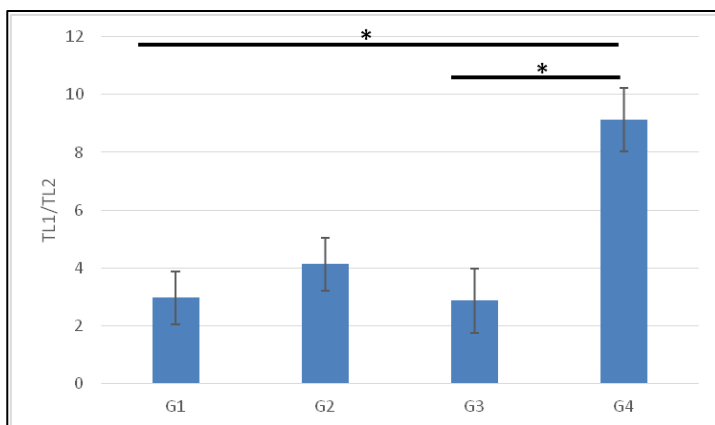


Gráfico 2. Comparativo das razões TL1/TL2 entre os grupos experimentais - LCE.

*Indica diferença estatística para $p < 0,05$ após ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey; colunas representam médias e barras de erros indicam erro padrão da média.

G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

5.1.3 Tarefa de Reconhecimento de Objetos

No caso da TRO, foi avaliado o índice de discriminação de objeto novo (IDON), que é igual ao tempo de exploração do objeto novo (ON) sobre o tempo total de exploração (sobre ambos os objetos, ON e objeto conhecido (OC), sendo uma porcentagem: $IDON = ON * 100 / (ON + OC)$, em que se espera que o tempo de contato com o ON seja maior que 50% do tempo total de exploração, significando que os animais conseguiram reconhecer o OC.

A análise estatística dos dados presentes na Tabela 4 não mostra diferença entre os grupos, mesmo com a exclusão dos *nonperformers* (G1F e G4F – animais que não exploraram a caixa, ficaram imóveis) (Gráfico 3). No entanto, existiram algumas diferenças que, embora não sejam estatisticamente significativas, são interessantes de se salientar: de todos os grupos, o grupo G2 (idosos do grupo controle) foi o que teve a menor quantidade de animais capazes de reconhecer o OC (2 de 5 - 40%), enquanto o grupo idoso suplementado (G4) teve 4 animais, entre 5 que responderam ao teste (80%), capazes de reconhecer o OC, apresentando, portanto, um índice melhor que os dos animais adultos maduros, suplementados ou não (67% e 60%, respectivamente). Apesar de falta de significância estatística no índice de reconhecimento do objeto novo, isto implica que o envelhecimento pode ter afetado negativamente esse parâmetro, sendo revertido com a suplementação alimentar de forma razoável, inclusive foram melhorados os índices dos animais adultos (de 60% para 67%) que reconheceram os objetos.

Adicionalmente, assim como constatado no LCE, o animal G1F, com massa corpórea abaixo da média, também não respondeu ao TRO, enquanto que G2D, que foi um *nonperformer* no LCE, no TRO apresentou déficit de memória. Além disso, animais que apresentaram déficit no LCE, como G1A e G3A, no TRO tiveram desempenho satisfatório. Isto demonstra que diferentes animais podem ter alterações em tipos específicos de memória, e quando alterações estão presentes, não necessariamente afetam todos os tipos de memória no mesmo animal.

Tabela 4. Resultados de todos os grupos com relação ao desempenho de memória/aprendizado na TRO.

Tarefa de Reconhecimento de Objeto			
Grupos	IDON = $ON \cdot 100 / (ON + OC)$	RECONHECEU OC	%
G1			
G1A	79	SIM	60
G1B	54	SIM	
G1C	75	SIM	
G1D	39	NÃO	
G1E	22	NÃO	
G1F	Não se moveu no teste (nonperformer)		
G2			
G2A	73	SIM	40
G2B	45	NÃO	
G2C	54	SIM	
G2D	40	NÃO	
G2E	41	NÃO	
G3			
G3A	56	SIM	67
G3B	66	SIM	
G3C	32	NÃO	
G3D	65	SIM	
G3E	57	SIM	
G3F	42	NÃO	
G4			
G4A	74	SIM	80
G4B	91	SIM	
G4C	36	NÃO	
G4D	78	SIM	
G4E	70	SIM	
G4F	Não se moveu no teste (nonperformer)		

G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

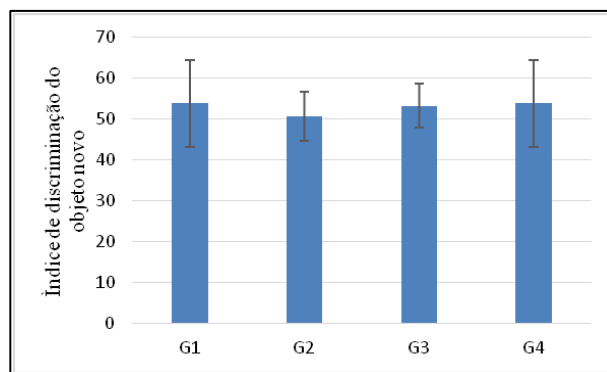


Gráfico 3. Índice de discriminação do objeto novo – TRO.

Os grupos experimentais não diferem entre si na média. Valores expressos em média (barras) e erro padrão da média (barras de erros). G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

5.1.4 Labirinto Aquático de Morris

No que diz respeito ao aprendizado e memória no LAM, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada, exceto pela melhora desse parâmetro nos animais idosos suplementados com relação aos não suplementados (Gráfico 4). Mais uma vez, apesar da falta de significância estatística, parece haver uma forte tendência para prejuízo em memória/aprendizado no LAM para os animais idosos não suplementados, prejuízo esse revertido aos níveis normais dos adultos após a suplementação.

Os animais G1B, G2B, G3B foram classificados como *nonperformers* (e excluídos da análise) pois os animais jovens (G1B e G3B), ao invés de nadar até encontrar a plataforma nos dias de treinamento e no dia do desafio, pelo contrário, eles evitavam o quadrante da plataforma, e não subiam nela mesmo quando a encontravam; e quando eram guiados e colocados sobre a mesma (segundo o protocolo do teste) não permaneciam sobre a plataforma nem por 5 segundos, mas pulavam novamente na água. O animal G1F foi excluído (como em todos os testes) por motivo de baixo peso (50% do peso dos demais animais), mesmo sendo o único teste em que ele se comportou da maneira esperada.

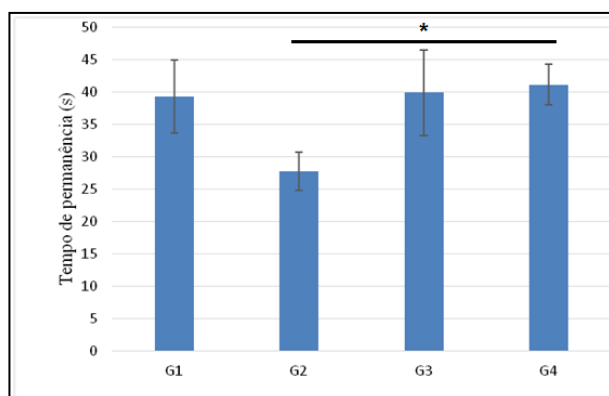


Gráfico 4. Desempenho de memória/aprendizado no LAM.

*indica diferença estatística para $p < 0,05$ no teste t-não pareado.

G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle;

G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

5.2 Envelhecimentos, alterações funcionais, e alterações cromatínicas em neurônios e gliócitos de camundongos.

Os resultados indicam alterações estruturais importantes na organização cromatínica e nuclear com o envelhecimento em neurônios. Em geral, núcleos de neurônios sofrem descompactação cromatínica em animais idosos, o que se conclui pela queda estatisticamente significativa no valor de OD (densidade óptica média) (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros de análise de imagem para neurônios corados após reação de Feulgen.

Grupos	Parâmetros					
	Área nuclear (μm^2)	OD		IOD	Contraste	Entropia
	M	\bar{x}	$\sigma_{\bar{x}}$	M	M	M
G1	51,23 a	0,32 a	0,005	16,60 a	15,46 a	7,26 a
G2	60,29 b	0,28 b	0,005	17,15 a	15,51 a	7,07 b
G3	63,27 b	0,30 c	0,005	19,43 b	16,85 a	7,14 c
G4	63,84 b	0,26 d	0,006	16,55 a	14,73 a*	7,04 b

IOD, densidade óptica integrada ou valores Feulgen-DNA; M, mediana; OD, densidade óptica média por núcleo; \bar{x} , média aritmética; $\sigma_{\bar{x}}$, erro padrão da média. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$. * estatisticamente diferente de G3. G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

Há, em animais idosos não suplementados, um aumento discreto no conteúdo Feulgen-DNA (IOD) (Tabela 5), explicado por um pequeno aumento na quantidade de núcleos tetraploides (Figura 1A), mas que não causou alteração estatisticamente significativa na média do grupo. Sendo assim, considerando valores Feulgen-DNA muito semelhantes, a

descompactação pode ser um indício de aumento de área nuclear sem aumento proporcional do conteúdo Feulgen-DNA, o que de fato ocorreu (Tabela 5), e em quase todos os núcleos (Figura 1E). Essa descompactação veio acompanhada de uma reorganização da cromatina, de forma que os núcleos se tornaram um pouco mais homogêneos (queda da Entropia) (Figura 1C), mas sem alterações substanciais no contraste entre áreas compactadas e descompactadas (Tabela 5) (Figura 1D). Isso indica que a descompactação é decorrente simplesmente de um maior espalhamento da cromatina num volume nuclear maior, e não de alterações nos níveis de compactação de áreas eu- ou heterocromáticas.

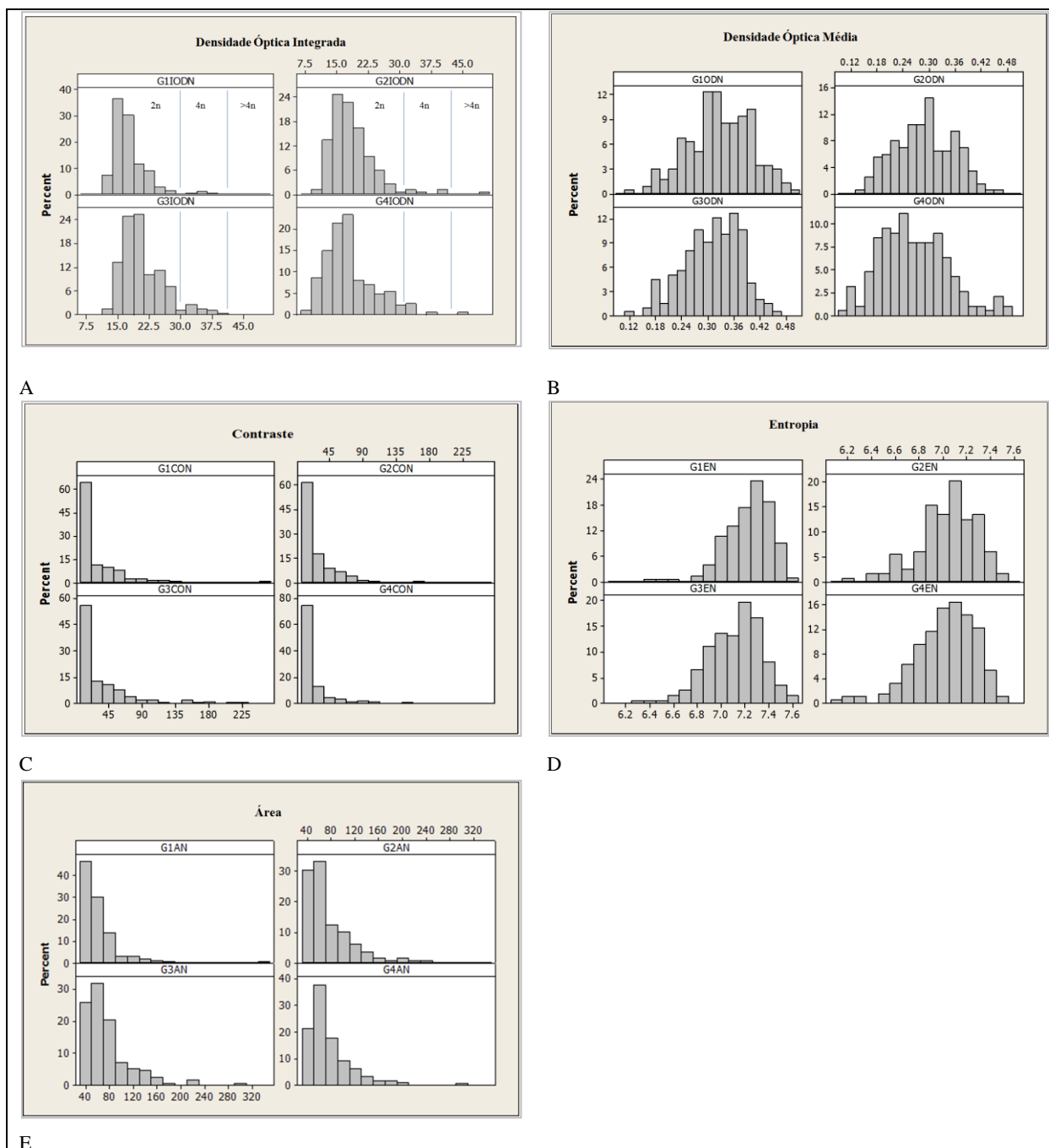


Figura 1. Análise da distribuição dos parâmetros avaliados para os neurônios.

G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

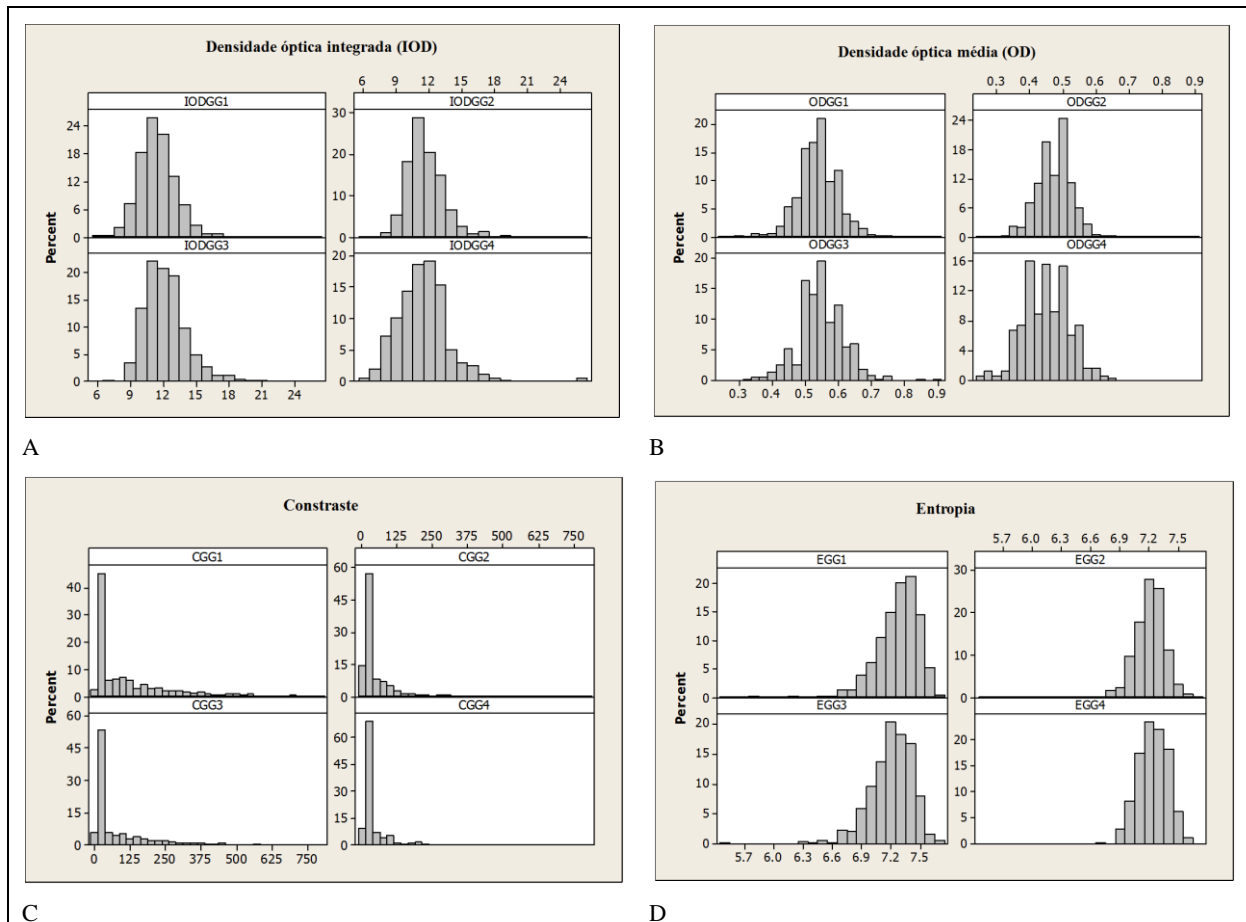
Contrariamente aos testes cognitivos, onde a suplementação alimentar nos animais idosos altera alguns parâmetros cognitivos aos patamares observados nos animais mais jovens, em termos estruturais, as alterações vistas com o envelhecimento em neurônios, mais especificamente o aumento das áreas nucleares associado com descompactação de cromatina, não são revertidas, sendo, inclusive, potencializadas (Tabela 5; Figura 3. G4, Nn). Ainda mais surpreendente foi constatar que a suplementação nos animais adultos causou as mesmas

alterações estruturais vistas nos animais idosos (aumento de áreas nucleares, poliploidização, descompactação cromatínica), tendo, dessa forma, uma influência negativa em neurônios (Figura 3. G3, Nn.). Esta constatação mostra que os efeitos benéficos da suplementação alimentar nos idosos, do ponto de vista funcional, não são acompanhadas de alterações estruturais relacionadas com o fenótipo mais jovem. Em outras palavras, as alterações nucleares associadas ao envelhecimento em neurônios de camundongos não podem ser revertidas pela suplementação alimentar.

Tabela 6. Parâmetros de análise de imagem para gliócitos corados após reação de Feulgen.

Grupos	Parâmetros				
	Área nuclear (μm^2)	OD	IOD	Contraste	Entropia
	M	M	M	M	M
G1	21,31 a	0,54 a	11,29 a	44,85 a	7,30 a
G2	24,18 b	0,48 b	11,40 a	17,98 b	7,21 b
G3	21,52 a	0,55 a	12,00 b	25,81 c	7,22 b
G4	24,61 b	0,45 c	11,38 a	19,51 b	7,24 b

IOD, densidade óptica integrada ou valores Feulgen-DNA; M, mediana; OD, densidade óptica média por núcleo. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$. G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.



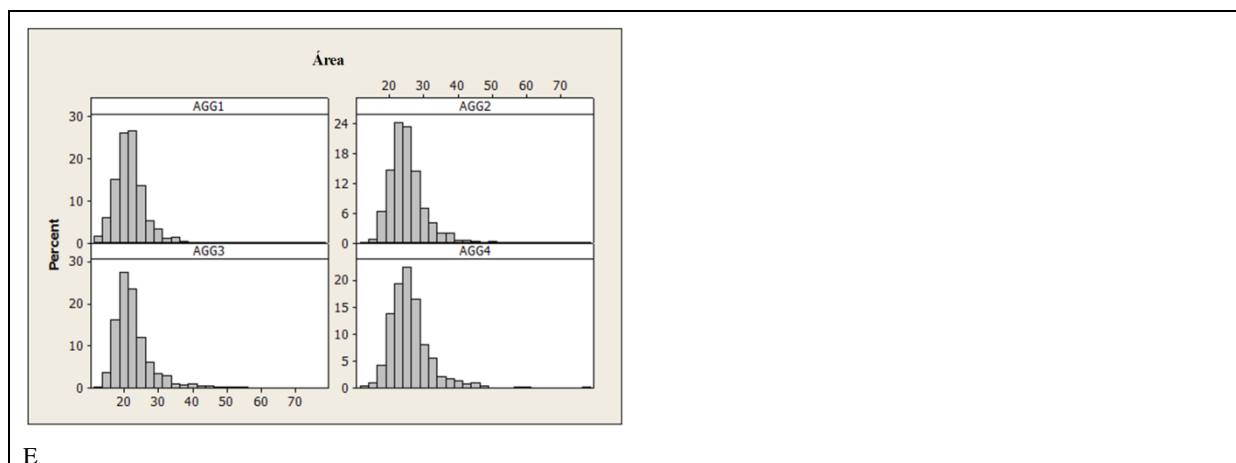


Figura 2. Análise da distribuição dos parâmetros avaliados para os gliócitos.

G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

Já para os gliócitos em geral, assim como constatado para neurônios, há uma correlação positiva entre envelhecimento, e descompactação cromatínica, o que se comprova pela queda no valor de OD nos animais idosos não suplementados (Tabela 6) (Figura 3. G2, Ng.). Assim como para neurônios, não há alterações significativas no conteúdo Feulgen-DNA (IOD) em gliócitos, mas há aumento de áreas nucleares com a idade, o que causou um espalhamento da cromatina. Entretanto, diferentemente de neurônios, o envelhecimento em gliócitos veio também acompanhado de uma alteração substancial do contraste, indicando descompactação de áreas previamente heterocromáticas. Assim a descompactação se deu de duas formas, pela perda de sobreposição de áreas nucleares antes sobrepostas, diminuindo sua OD, e também pela diminuição do grau de compactação de áreas heterocromáticas, também contribuindo para a diminuição de OD. Adicionalmente, todas essas alterações levaram a uma diminuição do grau de desordem nuclear (diminuição de entropia), com os núcleos adquirindo um aspecto ligeiramente mais homogêneo, praticamente imperceptível a olho, mas mensurável pelo *software* de análise (Tabela 6).

Assim como observado para neurônios, a suplementação alimentar também não reverte as alterações associadas com o envelhecimento, inclusive piorando alguns dos parâmetros. Novamente, o possível efeito negativo em termos estruturais da suplementação observado em animais idosos, foi observado para alguns parâmetros também em animais adultos (Tabela 6) (Figura 3. G4, Ng.).

Em todos os grupos e tratamentos avaliados, é importante observar que as alterações não foram globais, afetando apenas parte da população de núcleos, como é possível concluir pela observação dos histogramas da Figura 2.

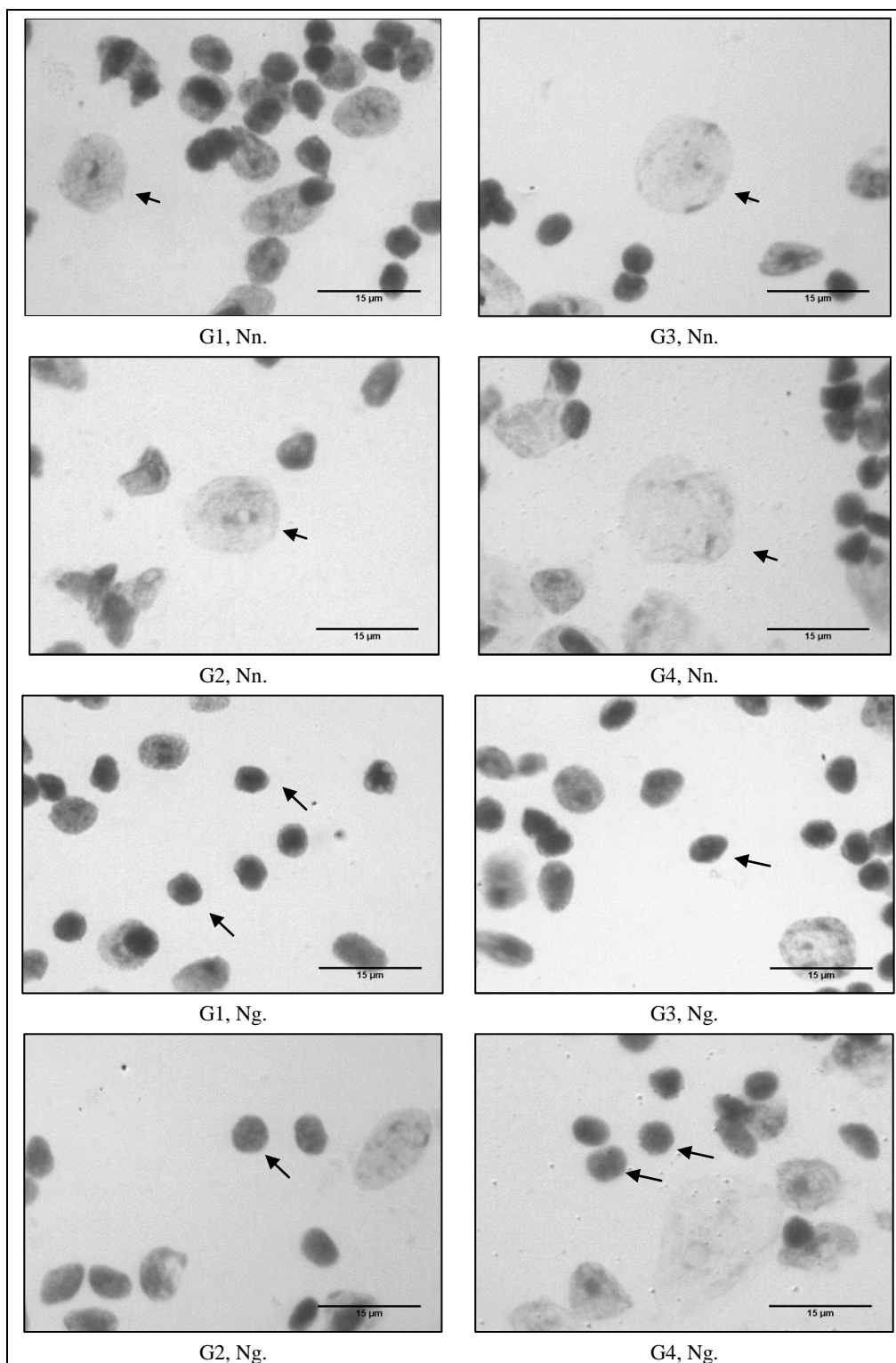


Figura 3. Núcleos de neurônios e gliócitos após a reação de Feulgen.

Os grupos são representados por G1, G2, G3 e G4. Nn. = núcleo de neurônio; Ng = núcleo de gliócito. Núcleos destacados pelas setas. No grupo G2 e G3, e principalmente no G4, observam-se núcleos aumentados e descompactos, com cromatina mais homogênea e difusa; comparar com o núcleo de neurônio do G1. Gliócitos ligeiramente maiores e mais descompactos são observados nos grupos G2, e principalmente G4, ao contrário do grupo G1, e G3 com gliócitos mais compactados. É possível observar um núcleo de neurônio bastante descompacto em G4, Ng. (não apontado pela seta). G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

5.3 Parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo

Adicionalmente aos parâmetros estruturais, buscou-se avaliar também parâmetros bioquímicos relacionados com estresse oxidativo no encéfalo dos camundongos. Sabe-se que há uma correlação positiva entre envelhecimento e estresse oxidativo e que alterações em enzimas relacionadas com as defesas antioxidantes podem ser observadas em animais idosos.

A primeira observação importante refere-se ao conteúdo proteico total (Figura 4A), para o qual se observou diminuição considerável com o envelhecimento. Analisando os dados do ponto de vista estatístico, nota-se que a falta de diferença entre o grupo 4, de idosos suplementados, tanto quando comparado com seu controle não suplementado, quanto quando comparado com os animais mais jovens, demonstra que a suplementação teve influência positiva nesse parâmetro em animais idosos, elevando o conteúdo proteico total para patamares intermediários entre os idosos não suplementados e os animais adultos maduros, suplementados ou não. Nestes últimos, a suplementação pareceu não surtir qualquer efeito mensurável no conteúdo proteico total.

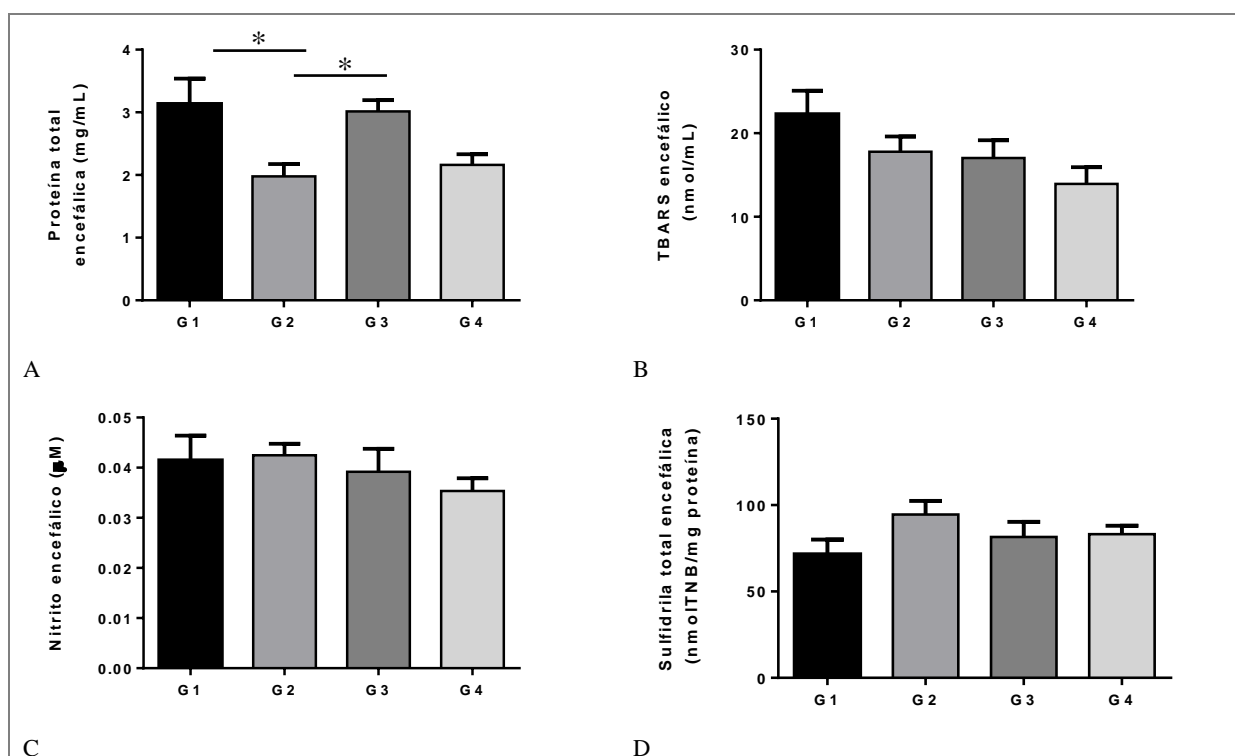


Figura 4. Parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo.

* indica diferença estatística para $p < 0,05$, ANOVA.

G1 = grupo adulto maduro controle; G2 = grupo idoso controle; G3 = grupo adulto maduro suplementado; G4 = grupo idoso suplementado.

De forma surpreendente, entretanto, no que diz respeito aos marcadores de estresse oxidativo, nenhuma alteração associada ao envelhecimento ou à suplementação alimentar nos níveis de peroxidação lipídica (Figura 4.B), presença de nitrito (Figura 4C), ou conteúdo de radicais sulfidril (Figura 4D) foi encontrada.

6. DISCUSSÃO

Os mecanismos moleculares subjacentes às alterações de memória no envelhecimento não são atualmente conhecidos, tendo sido apontadas as alterações de cromatina (PENNER et al. 2010). Atualmente, há certo número de intervenções para aumentar o tempo de vida saudável, que incluem uma intervenção nutricional com restrição calórica (RC), e a inibição da via TOR (mTOR). A RC claramente resulta em aumento da longevidade em várias espécies, incluindo leveduras, *C. elegans*, moscas e roedores, mas curiosamente, em primatas os resultados são conflitantes (NEWGARD, C. B., SHARPLESS, N. E. 2013).

Neste trabalho, a suplementação alimentar pareceu provocar melhor desempenho de memória/aprendizado nos testes comportamentais LCE, e LAM, sendo que em ambos, o grupo idoso suplementado (21 meses) apresentou desempenho melhor ou semelhante ao de animais mais jovens. Estes resultados condizem com os efeitos mostrados por estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a suplementação com FC, que promove crescimento de axônios, aumento da expressão de proteínas pré e pós-sinápticas específicas, aumento de formações dendríticas, os quais são todos pré-requisitos para formação e função de sinapses (SHAH, R. C., et al, 2013; RIJPMAN, A., et al, 2015). Além disso, alguns estudos mostram que uma maior ingestão de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) está associada ao melhor funcionamento cognitivo, menor risco de CCL e doença de Alzheimer (FONTANI, G., et al. 2005; BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J., 2015).

Mais especificamente, porém, embora a suplementação tenha provocado melhora no grupo idoso, o envelhecimento não pareceu estar associado com prejuízos de memória/aprendizado no LCE nos camundongos, dada a sobreposição de desempenho entre os grupos idosos e mais jovens. Porém, o aparato LCE é de grande aversão para o animal, tanto que é utilizado classicamente para avaliação de ansiedade (autor). Dessa forma, os animais considerados *nonperformers* podem simplesmente ter permanecido imóveis por reflexo do seu estado aversivo no aparato, e não por prejuízo de memória/aprendizado.

Há que se considerar também, entretanto, que a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na TRO possa ter sido causada por pouca relevância dos objetos utilizados para alguns animais (HEYSER, C. J.; CHEMERO, A., 2012; ANTUNES, M.; BIALA, G., 2012). O mau desempenho não se deu em todos os indivíduos idosos, assim como nem todos os adultos jovens apresentaram desempenho superior, como também foi documentado por Vaucher e colaboradores (2002) em experimento com fêmeas jovens (5 meses) e idosas (24 meses) C57/Bl na tarefa de reconhecimento de objetos.

No que diz respeito ao desempenho em memória/aprendizado no LAM, houve melhora desse parâmetro nos animais idosos suplementados com relação aos não suplementados, dado que os resultados do grupo idoso suplementado foram semelhantes aos resultados dos grupos mais jovens, suplementados ou não, assim como já observado por Nils (2015), porém, em experimentos com ratos.

Lamberty e Gower (1992) compararam, entre outros parâmetros, a aprendizagem de camundongos fêmeas virgens NMRI de 3, 11, 17 e 22 meses de idade. No LCE, o desempenho foi drasticamente reduzido em indivíduos com 17 e 22 meses de idade. A aprendizagem espacial foi marcadamente prejudicada a partir da idade de 11 meses, como indicado por latências mais longas no labirinto aquático. Para a maioria das tarefas, os camundongos idosos não apresentavam graus semelhantes de comprometimento entre as variáveis comportamentais e, para uma determinada idade cronológica, o grau de comprometimento é heterogêneo. Entretanto, foi observado por Vicensa e colaboradores (1999) que camundongos NMRI treinados em labirinto aquático apresentam melhor desempenho do que os camundongos C57BL, demonstrando que os efeitos de um treinamento inicial no labirinto da água podem ser influenciados pelas características da linhagem de camundongos.

Em outro experimento sobre suplementação alimentar e testes comportamentais, camundongos sob uma dieta hipercalórica (que sabidamente causa déficits cognitivos como no envelhecimento) suplementada com *blueberry* foram capazes de reconhecer o OC na TRO (67% do tempo de exploração no ON), ao contrário dos animais sob dieta hipercalórica sem suplementação. Da mesma forma, no LAM, os animais com dieta hipercalórica passaram menos frequentemente pelo local da plataforma do que os animais com dieta hipocalórica, e os animais com dieta hipercalórica suplementada com *blueberry* apresentaram resultados semelhantes aos animais em dieta hipocalórica no LAM (CAREY, A. N.; GOMES, S. M.; SHUKITT-HALE, B., 2014). No entanto, no ensaio de Harrison e colaboradores (2009) sobre dieta e comportamento de animais, foram administrados suplementos dietéticos em longo prazo a camundongos idosos APP/PSEN1 (duplo transgênico para DA) contendo apenas vitamina C (1g/kg ração), ou vitamina C em combinação com vitamina E em alta dose (750 IU/kg ou 1125 mg/kg), ou em dose mais baixa (400 IU/kg ou 600 mg/kg). A combinação vitamínica de alta dose prejudicou o desempenho de camundongos de ambos os genótipos (transgênico e selvagem) no LAM. O tratamento com doses mais baixas de vitamina C e E atenuou os déficits de memória espacial em camundongos APP/PSEN1, e melhorou o desempenho do tipo selvagem no LAM.

Com relação aos animais *nonperformers*, a literatura científica mostra que é mais comum encontrá-los entre camundongos do que entre ratos, sendo o problema mais comum no LAM o de que alguns camundongos flutuam e parecem desmotivados para escapar do tanque (VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T., 2006), assim como ocorreu com alguns animais no presente trabalho.

Os resultados indicaram alterações estruturais importantes na organização cromatínica e nuclear com o envelhecimento em neurônios, em que os núcleos de neurônios de animais idosos apresentaram aumento de área nuclear, sem aumento proporcional do conteúdo Feulgen-DNA, mostrando descompactação, a qual veio acompanhada de uma reorganização da cromatina, tornando-se os núcleos mais homogêneos, com maior espalhamento da cromatina num volume nuclear maior, o que, de fato, ocorre geralmente em núcleos de neurônios em animais idosos (RODRIGUES, H. F. et al, 2014). Da mesma forma, para os glíócitos em geral houve uma correlação positiva entre envelhecimento e descompactação cromatínica, com aumento de áreas nucleares sem alterações significativas no conteúdo Feulgen-DNA, o que causou um espalhamento da cromatina. Entretanto, diferentemente de neurônios, o envelhecimento em glíócitos veio também acompanhado de uma alteração substancial do contraste, indicando descompactação de áreas previamente heterocromáticas, uma diminuição do grau de desordem nuclear, com aspecto ligeiramente mais homogêneo. Assim como observado para neurônios, a suplementação alimentar também não reverte as alterações associadas com o envelhecimento, inclusive piorando alguns dos parâmetros.

Pelo fato de os neurônios serem considerados células pós-mitóticas (ciclo celular parado em G0) (HERRUP, K.; YANG, Y., 2007), espera-se que o aumento do conteúdo de DNA (IOD) signifique aumento na ploidia (FRADE, J. M., 2010). Alguns dados indicam que a tetraploidia neuronal também possa indicar a reativação do ciclo celular, como foi visto em neurônios retiniais de galinhas (MORILLO, S. M., et al 2010), enquanto no caso dos neurônios, reentrar no ciclo celular tem sido classicamente sinônimo de apoptose (WHALLEY, L. J. et al., 2004). A neurodegeneração pode acarretar a tetraploidização, seguida de hipertrofia neuronal, com alteração da função e circuitos neuronais que conduzem à neurodegeneração (MOSCH, B., et al. 2007). Assim, o estímulo a tetraploidização encontrada nos neurônios de adultos maduros neste trabalho pode estar associada a uma agressão tecidual, o que ajudaria a explicar o fato de o desempenho dos adultos maduros nos testes comportamentais não ter sido muito diferente do encontrado em animais idosos.

Os adultos maduros suplementados apresentaram evidências de indução à proliferação celular em células gliais. O estímulo à proliferação celular da glia com o tratamento também

ocorreu nos animais idosos, embora tenha sido menos acentuado do que nos adultos maduros, mas também pelo fato de que em cérebros com idade avançada, em geral, a proliferação glial em resposta a uma agressão é menos acentuada do que em cérebros adultos maduros (SUSARLA, B. T. S. et al., 2014). A proliferação celular encontrada tanto nos idosos como nos adultos maduros suplementados pode ser mais um indicador de efeito negativo da dieta sobre os cérebros desses animais (ROLLS, A.; SHECHTER, R.; SCHWARTZ, M., 2009), conflitando com os resultados nos testes cognitivos, isso se for considerado que a presença de estímulo à proliferação celular e a descompactação da cromatina sejam sempre efeitos negativos.

Alterações estruturais na cromatina podem estar associadas a alterações de padrão de expressão gênica, os quais, por sua vez, podem ter relação com alterações funcionais, como por exemplo, mudanças na capacidade cognitiva do animal durante o envelhecimento. Dessa forma, a avaliação *in situ* das alterações morfológicas nucleares pode dar uma ideia de possíveis causas estruturais em nível celular para as alterações funcionais detectadas nos testes cognitivos. No espaço limitado do núcleo, a cromatina é organizada de forma dinâmica e não aleatória, sendo que a topologia cromatínica tem sido já correlacionada com mecanismos envolvidos nos processos de memória e aprendizado (WATSON, L. A.; TSAI, L. H., 2016). Mas as alterações na cromatina que ocorrem durante o processo de envelhecimento são mal documentadas e compreendidas em organismos superiores, tais como mamíferos (KREILING, J. A. et al., 2011).

O estresse oxidativo tem sido visto como um fator contribuinte no envelhecimento e na progressão de várias doenças neurodegenerativas (DIZDAROGLU, M., 1992). O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio juntamente a uma redução na defesa antioxidante associada à idade afeta diretamente a atividade sináptica e a neurotransmissão dos neurônios, levando à disfunção cognitiva (TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E., 2016). O cérebro tem se mostrado um órgão vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu alto consumo de oxigênio e de ácidos graxos poli-insaturados facilmente oxidáveis; além de apresentar menor atividade antioxidante em relação aos demais tecidos (FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J., 2000). Em condições normais, o sistema neuronal é capaz de neutralizar os processos oxidativos regulando o seu equilíbrio homeostático. No entanto, a ideia de que o estresse oxidativo aumenta com o avanço da idade tem sido correlacionada com maior suscetibilidade à disfunção mitocondrial e lesão neuronal e, por consequência, às doenças neurodegenerativas (ARLT, S., et al, 2002). No presente trabalho, embora tenha sido observada diminuição considerável do conteúdo de proteína total com o envelhecimento, com

influência positiva nesse parâmetro em animais idosos suplementados, surpreendentemente, não foram encontradas alterações associadas ao envelhecimento ou à suplementação alimentar quanto às análises de marcadores do estresse oxidativo: TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), Griess e conteúdo de sulfidrilas totais, os quais se relacionam à peroxidação lipídica, biodisponibilidade de óxido nítrico e o efeito antioxidante de proteínas, respectivamente. Algo semelhante resultou dos experimentos de Hosseini e colaboradores (2017), que mostraram que a expressão gênica das principais respostas ao estresse oxidativo não coincide com a neuroinflamação no envelhecimento ou com a susceptibilidade regional aumentada a doenças neurodegenerativas importantes e, portanto, não é preditiva da neurodegeneração no envelhecimento. Seus resultados foram obtidos após analisar a expressão na transcrição de genes de resposta inflamatória inata em onze regiões cerebrais representativas, incluindo frontal, parietal, temporal inferior, cíngulo, occipital, córtex entorrinal, caudado, putamen, tálamo, substância negra e vermis cerebelar em cérebros humanos idosos. De forma semelhante, López-González, Cordoní, e Ferrer (2017) realizaram estudo sobre suplementação alimentar em ratos com ácido β -D-manurônico (M2000), um agente anti-inflamatório e anti-envelhecimento imunossupressor não esteroide, o qual apresentou efeitos favoráveis em várias enzimas e na expressão gênica da resposta antioxidante, embora estes achados não tenham sido acompanhados de diferenças estatisticamente significativas nos níveis dos marcadores de oxidação de lipídeos e proteínas, e capacidade antioxidante total.

Como se vê, os resultados obtidos neste trabalho não são óbvios em conectar, ao mesmo tempo, o desempenho cognitivo com as alterações em parâmetros morfométricos de organização de cromatina em células neuronais e neurogliais, e ainda com o estresse oxidativo nos encéfalos dos animais estudados. Mas também, pouco ainda se sabe sobre as causas do comprometimento cognitivo no envelhecimento normal, visto que as preocupações com a síndrome do CCL são quase exclusivamente pelo fato de ser um fator de risco para doenças neurodegenerativas (ANCELIN, M. L. et al, 2006), sendo frequentemente não estudada de forma exclusiva. Isto torna necessária a realização de mais estudos com enfoque sobre os mecanismos celulares e fisiológicos que levam ao declínio cognitivo decorrente do avanço na idade.

7. CONCLUSÃO

- ✓ A suplementação alimentar provocou melhor desempenho de memória/aprendizado nos testes comportamentais LCE, e LAM, com perfil do grupo idoso suplementado melhor ou semelhante aos animais mais jovens;
- ✓ Os resultados comportamentais, porém, não foram acompanhados das alterações na organização cromatínica e na resposta de estresse oxidativo, com relação aos animais suplementados;
- ✓ Núcleos de neurônios de animais idosos apresentaram descompactação e reorganização cromatínica nuclear, tornando-se os núcleos mais homogêneos, e a cromatina mais difusa dentro de um volume nuclear maior, como é característico de neurônios idosos;
- ✓ Foi encontrada uma tendência ao perfil estrutural idoso da cromatina de neurônios em animais mais jovens suplementados, com exacerbação nos idosos suplementados;
- ✓ Ocorreu o mesmo para os gliócitos, em geral; porém, o envelhecimento em gliócitos veio acompanhado de descompactação sutil de áreas previamente heterocromáticas;
- ✓ A proliferação da glia, encontrada tanto nos idosos como nos adultos maduros suplementados, pode ser mais um indicador de piora nas alterações relacionadas ao envelhecimento;
- ✓ Nos parâmetros bioquímicos dos encéfalos não foram encontradas alterações associadas ao envelhecimento ou à suplementação alimentar nos níveis dos marcadores de estresse oxidativo, o que é corroborado por estudos em que o perfil de estresse oxidativo não foi preditivo da neurodegeneração no envelhecimento;
- ✓ Assim, são necessários mais estudos no sentido de promover, através dos alimentos, a manutenção da função cognitiva em adultos saudáveis, e a prevenção contra um maior declínio daqueles já acometidos de perdas significativas em cognição.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. U. Genetic Control of Aging and Life Span. **Nature Education**, United States, p. 130, 2008.
- ADAMS, P. D. Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. **Gene**. V. 397, n. 1–2, 84–93 pp. August 2007. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.020>
- AIRD, K. M.; ZHANG, R. Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). **Methods Mol Biol**. V. 965: 185–196 pp. 2013. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_12
- AKSENOV, M. Y., MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n.2, p. 141-145, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALFERT M.; GESCHWIND, I. I. A Selective Staining Method for the Basic Proteins of Cell Nuclei. **Proc Natl Acad Sci U S A**. V. 39 n. 10: 991–999 pp. Oct. 1953. <https://doi.org/10.1073/pnas.39.10.991>
- ANCELIN, M. L. et al. Non-degenerative mild cognitive impairment in elderly people and use of anticholinergic drugs: longitudinal cohort study. **BMJ**. V. 25; n. 332(7539): 455-459 pp. Feb, 2006. <https://doi.org/10.1136/bmj.38740.439664.DE>
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cogn Process**. V. 13, n. 2: 93–110 pp. May, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z>
- ARLT, S.; BEISIEGEL, U.; KONTUSH, A. Lipid peroxidation in neurodegeneration: new insights into Alzheimer's disease. **Curr Opin Lipidol**. V. 13: 289–294 pp, 2002. <https://doi.org/10.1097/00041433-200206000-00009>
- BAILEY, R; ARAB, L. Nutritional Prevention of Cognitive Decline. **Adv Nutr**. V. 3: 732-733 pp. September, 2012. <https://doi.org/10.3945/an.112.002667>
- BANNISTER, Andrew J.; KOUZARIDES, Tony. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell research**, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Diet-Induced Cognitive Deficits: The Role of Fat and Sugar, Potential Mechanisms and Nutritional Interventions. **Nutrients**. V. 7, n. 8: 6719–6738 pp. Aug 2015. <https://doi.org/10.3390/nu7085307>
- BENAYOUN, B. A.; POLLINA E. A.; BRUNET, A. Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, United States, v.16, p. 593-610, October 2015. <https://doi.org/10.1038/nrm4048>

BENZEI, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: **The FRAP Assay**. V. 239, p. 70-76, 1996.
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

BERGER, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**. V. 447, 407-412 pp, 2007. <https://doi.org/10.1038/nature05915>

BERKOWITZ, E. M., SANBORN, A. C., VAUGHAN, D. W. Chromatin Structure in Neuronal and Neuroglial Cell Nuclei as a Function of Age. **Journal of Neurochemistry**. V. 41, n. 2; 516–523 pp. February 1983. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1983.tb04769.x>

BISHOP, N. A., LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, 464, 529–535 pp. March 2010. <https://doi.org/10.1038/nature08983>

BOYLE P.A., et al. Mild cognitive impairment: risk of Alzheimer disease and rate of cognitive decline. **Neurology**. V. 8;67(3):441-445pp. Aug 2006.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000228244.10416.20>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, 248–254 pp, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BRENNER, C.; FUKS, F. A methylation rendezvous: reader meets writers. **Developmental cell**, v. 12, n. 6, p. 843-844, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.05.011>

BRUCKI, S. M. D. Epidemiology of Mild Cognitive Impairment in Brazil. **Dement. neuropsychol.** São Paulo, v. 7, n. 4, p. 363-366, Dec. 2013. <https://doi.org/10.1590/S1980-57642013DN74000002>

BUEGE, J. A.; AUST S. D. Microsomal lipid peroxidation: **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)

BUSUTTIL, R.; BAHAR, R.; VIJG, J. Genome dynamics and transcriptional deregulation in aging. **Neuroscience**. V. 145, 1341– 1347 pp. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.09.060>

CADET, J.; DAVIES, K. J. A. Oxidative DNA Damage & Repair: An Introduction. **Free Radical Biology and Medicine**. V. 106, 100–110 pp. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.017>

CAMPISI J. Cancer, aging and cellular senescence. **In Vivo (Athens, Greece)**. V. 14, n.1:183-188 pp. Jan-Feb 2000.

CAREY, A.N.; GOMES, S. M.; SHUKITT-HALE, B. Blueberry supplementation improves memory in middle-aged mice fed a high-fat diet. **J Agric Food Chem**. May, 2014. V. 7; n. 62(18):3972-8. <https://doi.org/10.1021/jf404565s>

CEDERHOLM T., SALEM N., JR., PALMBLAD J. Omega-3 fatty acids in the prevention of cognitive decline in humans. **Adv. Nutr.** V.4: 672–676 pp. (Bethesda) 2013.
<https://doi.org/10.3945/an.113.004556>

CHEN, B; Co, C; Ho, C. Cell shape dependent regulation of nuclear morphology.

Biomaterials, v. 67, Outubro de 2015, 129–136 pp.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.017>

CHOI, J.; YU, B. P. Brain synaptosomal aging: Free radicals and membrane fluidity. **Free Radical Biology and Medicine**. V. 18, n. 2, 133-139 pp. February 1995.

[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00106-T](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00106-T)

CONDE, J. R.; STREIT, W. J. Microglia in the Aging Brain. **J Neuropathol Exp Neurol**. V. 65, n.3: 199-20 pp. March 2006. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000202887.22082.63>

CUTLER, R G. Antioxidants and aging. **Am J Clin Nutr**. V. 53 no. 1 373S-379S. January 1991. <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.1.373S>

DAMASCENO, B. P. Envelhecimento cerebral: o problema dos limites entre o normal e o patológico. **Arq. Neuro-Psiquiatr**. São Paulo , v. 57, n. 1, p. 78-83, Mar. 1999.

<https://doi.org/10.1590/S0004-282X1999000100015>

DEITCH, A. D.; WAGNER, D.; RICHART, R. M. CONDITIONS INFLUENCING THE INTENSITY OF THE FEULGEN REACTION. **J Histochem Cytochem**. Vol 16, n. 5; 371 – 379 pp. May 1968. <https://doi.org/10.1177/16.5.371>

D'HOOGE, R.; DE DEYN, P.P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Res Brain Res Rev**. V. 36: 60-90 pp. August 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00067-4)

DICKERSON, B. C. et al. Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD. **Neurology**. V. 65 no. 3 404-411 pp. August, 2005.

<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000171450.97464.49>

DIMAURO T., GREGORY D. Chromatin modifications: The driving force of senescence and aging? **Aging**, Albany, New York, v.1, ed. 2, p 182-190, February 2009.

<https://doi.org/10.18632/aging.100023>

DIZDAROGLU, M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. **Mutation Research/DNAging**. V. 275, n. 3–6, 331-342 pp; September 1992.

[https://doi.org/10.1016/0921-8734\(92\)90036-O](https://doi.org/10.1016/0921-8734(92)90036-O)

DIZDAROGLU, M.; GAJEWSKI, E. Structure and mechanism of hydroxyl radical-induced formation of a DNA protein cross-link involving thymine and lysine in nucleohistone.

Cancer Res., V. 49, 3463-3467 pp., 1989.

EGGER, Gerda et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-463, 2004. <https://doi.org/10.1038/nature02625>

ENNACEUR A, DELACOUR J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **I: Behavioral data. Behav Brain Res**. V. 31:47-59 pp. November, 1988.

[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)

FAURE, P.; LAFOND, J. L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: **Analysis of free radicals in biology systems**. Basel, Switzerland. pp. 237–248, 1995. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9074-8_17

FESER, J.; TYLER, J. Chromatin structure as a mediator of aging. **FEBS Letters**. V. 585, N. 13. 041–2048 pp. July 07, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.016>

FILE, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**. V. 58, N. 1–2, 20; 199–202 pp. December 1993. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90103-W](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90103-W)

FINCH, C. E. et al. Microglia and aging in the brain. In: STREIT, W. J. **Microglia in the Regenerating and Degenerating Central Nervous System**. New York: Springer; 2002: 275–305 pp. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4139-1_13

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. V. 408: 239–247 pp. 2000. <https://doi.org/10.1038/35041687>

FONTANI, G., et al. Cognitive and physiological effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in healthy subjects. **Eur. J. Clin. Invest.** 35:691–699. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2005.01570.x>

FRADE, J. M. Somatic tetraploidy in vertebrate neurons: Implications in physiology and pathology. **Commun Integr Biol.** 3(2): 201–203. Mar-Apr, 2010. <https://doi.org/10.4161/cib.3.2.11061>

FRANKS, F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. **Eur. J. Pharmac Biopharm.** V.45, N.3, 221–229 pp. May 1998. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00004-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00004-6)

GABRIELI, J. D. Disorders of memory in humans. **Current Opinion in Neurology & Neurosurgery**. V. 6 - N. 1. February 1993.

GALLAGHER, M.; BURWELL, R.; BURCHINAL, M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. **Behav Neurosci.** 107(4): 618–626 PP. August, 1993. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.107.4.618>

GARDNER, K. E.; ALLIS, C. D.; STRAHL, B D. OPERating ON Chromatin, a Colorful Language where Context Matters. **Journal of Molecular Biology**. V. 409, N. 1, 27 May 2011, 36–46 pp. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.040>

GAUTHIER, S., et al. Mild cognitive impairment. **Lancet**. 15;367(9518):1262–70. April, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68542-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68542-5)

GERSCHMAN, R., et al. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. **Science**. V.119: 623–626 pp, 1954. <https://doi.org/10.1126/science.119.3097.623>

GODINHO C. et al. Estimation of the risk of conversion of mild cognitive impairment of Alzheimer type to Alzheimer's disease in a south Brazilian population-based elderly cohort: the PALA study. **Int Psychogeriatr**. v 24:674–681pp. 2012. <https://doi.org/10.1017/S1041610211002043>

GOLDMAN, J. E. Aging and the brain. **Current Opinion in Neurology**. V. 7 - N. 4. August 1994. <https://doi.org/10.1097/00019052-199408000-00002>

- GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estud. av.** São Paulo, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100006>
- GÓMEZ-PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. **Nat Rev Neurosci**, United States, v. 9, p. 568–578, July 2008. <https://doi.org/10.1038/nrn2421>
- GOMEZ-PINILLA, F., TYAGI, E. Diet and cognition: interplay between cell metabolism and neuronal plasticity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. November 2013. 16(6):726-733. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328365aae3>
- GONZÁLEZ-GROSS, M., MARCOS A., PIETRZIK K. Nutrition and cognitive impairment in the elderly. **Br J Nutr.** ;86(3):313-21. Sep 2001. <https://doi.org/10.1079/BJN2001388>
- GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods Enzymol.** V. 268:237–246 pp., 1996. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)68026-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)68026-4)
- GUAN, J. S., et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic. **Nature**. V. **459**, 55-60pp. May 2009. <https://doi.org/10.1038/nature07925>
- GUARANTE, L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. **Genes & Dev.** V. 14: 1021-1026 pp. 2000.
- HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen-derived species, its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett.**, v. 281, 9-19 pp, 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80347-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80347-6)
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd ed., **Clarendon Press, Oxford**, 1989.
- HARALICK, R.M.; SHANMUGAM, K.; DINSTEN, I. Textural Features for Image Classification. **IEEE Transactions on Systems Man Cybernetics**. V. 3: 610-621 pp, 1973. <https://doi.org/10.1109/TSMC.1973.4309314>
- HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol.** V. 11: 298–300 pp, 1956. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- HARRISON, F. E. et al. Antioxidants and cognitive training interact to affect oxidative stress and memory in APP/PSEN1 mice. **Nutr Neurosci**. 2009 Oct; 12(5): 203–218. <https://doi.org/10.1179/147683009X423364>
- HERRUP, K.; YANG, Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology. **Nature Reviews Neuroscience**. V. 8, 368-378 pp. May 2007. <https://doi.org/10.1038/nrn2124>
- HEYSER, C. J.; CHEMERO, A. Novel object exploration in mice: Not all objects are created equal. **Behavioural Processes**. V. 89, n. 3, 232–238 pp. March 2012. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2011.12.004>
- HICKS, L. H.; BIRREN, J.E. Aging, brain damage, and psychomotor slowing. **Psychological Bulletin**, Vol 74(6), 377-396 pp. Dec 1970. <https://doi.org/10.1037/h0033064>

HOF, P. R.; MORRISON, J. H. The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. **Trends in Neurosciences**. V.27, n. 10, 607–613 pp. October 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.013>

HOLLIDAY, Robin. Epigenetics: a historical overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76-80, 2006. <https://doi.org/10.4161/epi.1.2.2762>

HOSSEINI, S. et al. Anti-aging effects of M2000 (β -D-mannuronic acid) as a novel immunosuppressive drug on the enzymatic and non-enzymatic oxidative stress parameters in an experimental model. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**. 20160092, ISSN (Online) 2191-0286. February 2017. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0092>

HOUSTON, I. et al. Epigenetics in the human brain. **Neuropsychopharmacology**. V. 38(1):183-197 pp. Jan. 2013. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.78>

IMAI, S.; GUARENTE, L. It takes two to tango: NAD⁺ and sirtuins in aging/longevity control. **Aging and Mechanisms of Disease**, United States, August 2016.
<https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.17>

ITOH, J.; NABESHIMA, T.; KAMEYAMA, T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. **Psychopharmacology**. V. 101, N. 1, pp 27–33. May 1990.
<https://doi.org/10.1007/BF02253713>

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>

JEON, J. Y. et al. MCH^{-/-} Mice Are Resistant to Aging-Associated Increases in Body Weight and Insulin Resistance. **Diabetes**. v.55 n. 2. 428-434 pp., Feb 2006.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-0203>

JIN, K. Modern Biological Theories of Aging. **Aging Dis**. V. 1, N.2: 72–74 pp. Oct. 2010.

KALVERDA, B.; RÖLING, M. D.; FORNEROD, M. Chromatin organization in relation to the nuclear periphery. **FEBS Letters**. V. 582, n 14, 2017–2022 pp. June 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.015>

KELLER, J. N., et al. Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. V. 36, N. 12, Pages 2376–2391. December 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.003>

KIRKWOOD, T. B. L. The most pressing problem of our age. **British Medical Journal**, England, v. 326, n. 7402, pp. 1297-1299, June 2003.
<https://doi.org/10.1136/bmj.326.7402.1297>

KOIVISTO H. et al. Special lipid-based diets alleviate cognitive deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mouse model of Alzheimer's disease independent of brain amyloid deposition. **J Nutr Biochem**, United States, v. 25, ed. 2, p. 157-169, February 2014.

KORNBERG, R. D. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. **Science** 24 May 1974: V. 184 no. 4139 pp. 868-871. <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868>

KREILING, J. A. et al. Age-associated increase in heterochromatic marks in murine and primate tN.s. **Aging Cell**, V.10, n.2, 292–304 pp. April 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00666.x>

LAMBERTY, Y.; GOWER, A. J. Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from maturity to middle age. **Physiology & Behavior**. V. 47, n. 6, 1137–1144 pp., June 1990. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90364-A](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90364-A)

LAMBERTY, Y.; GOWER, A. J. Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from middle to old age. **Physiology & Behavior**. V. 51, n. 1, 81–88 pp, January 1992. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90206-H](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90206-H)

LEVY, R. Aging-Associated Cognitive Decline. **International Psychogeriatrics**. V. 6, N. 1, 63-68 pp. March 1994. <https://doi.org/10.1017/S1041610294001626>

LIMKE, T. L.; RAO, M. S. Neural stem cells in aging and disease. **J Cell Molec Med**. V. 6, n. 4, 475–496 pp. October 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00451.x>

LIU, B.; YIP, R. K. H.; ZHOU, Z. Chromatin Remodeling, DNA Damage Repair and Aging. **Curr Genomics**. 13(7): 533–547. Nov. 2012. <https://doi.org/10.2174/138920212803251373>

LÓPEZ-GONZÁLEZ, I.; CORDOMÍ, C. T.; FERRER, I. Regional Gene Expression of Inflammation and Oxidative Stress Responses Does Not Predict Neurodegeneration in Aging. **J Neuropathol Exp Neurol**. nlw117. January 2017. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw117>

MALMROS, H. The Relation of Nutrition to Health. **Journal of International Medicine**. V. 138, 137–153 pp. January/December 1950. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1950.tb12300.x>

MALOUF, R., EVANS, J. G. Folic acid with or without vitamin B12 for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people. **Cochrane Database Syst Rev**. V. 4: CD004514. October, 2008. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004514.pub2>

MATOS, C. M. S. et al. Estudo da Estabilidade Físico-Química e Microscópica de Iogurte Natural Liofilizado durante o Armazenamento, p. 1524-1528. In: **In Anais do XXXVII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados - ENEMP 2015**. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2359-1757. Disponível em: <doi 10.5151/enemp2015-se-463> Acesso em: outubro, 2015.

MOGHBELA, A; ABBASPOURB, H. Study of Compressibility Properties of Yogurt Powder in Order to Prepare a Complementary Formulation. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 12 (3): 231-237, 2013.

MORILLO, S. M., et al. Somatic tetraploidy in specific chick retinal ganglion cells induced by nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci**. V.107 n.1. 109–114 pp. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906121107>

MORRISON, J. H.; HOF, P. R. Life and Death of Neurons in the Aging Brain. **Science**. V. 278, N. 5337, pp. 412-419. Oct 1997. <https://doi.org/10.1126/science.278.5337.412>

MOSCH B, et al. Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. **J Neurosci** 27:6859–6867. Jun, 2007. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0379-07.2007>

NEWGARD, C. B., SHARPLESS, N. E. Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities. **J Clin Invest**. V. 123, n.3: 946-950 pp. Mar 2013. <https://doi.org/10.1172/JCI68833>

NILS, A. V. M. **Treinamento em memória operacional em ratos idosos: efeitos na ansiedade, habituação, e densidade de células no hipocampo**. 2015. Tese (Doutorado em Ciências, Fisiologia Geral) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – USP. São Paulo, 2015. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41135/tde-15032016-113754> Acesso em: dezembro de 2016.

NORDEN, D. M.; GODBOU, J. P. Microglia of the Aged Brain: Primed to be Activated and Resistant to Regulation. **Neuropathol Appl Neurobiol**. V. 39 (1): 19–34 pp. Feb 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x>

OBERDOERFFER, P.; SINCLAIR, D.A. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. V. 8, 692– 702 pp. 2007. <https://doi.org/10.1038/nrm2238>

OGAWA, S. Nutritional management of older adults with cognitive decline and dementia. **Geriatr Gerontol Int**. V. 14 Suppl 2: 17-22 pp. April, 2014. <https://doi.org/10.1111/ggi.12252>

PANTIC, I.; PANTIC, S.; BASTA-JOVANOVIC, G. Gray Level Co-Occurrence Matrix Texture Analysis of Germinal Center Light Zone Lymphocyte Nuclei: Physiology Viewpoint with Focus on Apoptosis. **Microscopy and Microanalysis**. V. 18, n. 3, 470-475 pp. June 2012. <https://doi.org/10.1017/S1431927612000098>

PEARSON, E. C.; BUTLER, P. J. G.; THOMAS, G. O. Higher-order structure of nucleosome oligomers from short-repeat chromatin. **The EMBO journal**, v. 2, n. 8, p. 1367-1372, 1983. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1983.tb01593.x>

PENNER, M. R., et al. An Epigenetic Hypothesis of Aging-Related Cognitive Dysfunction. **Front Aging Neurosci**.; 2: 9. Mar 2010. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00009>

PUCKETT, R. E.; LUBIN, F. D. Epigenetic mechanisms in experience-driven memory formation and behavior. **Epigenomics**; V. 3, N.5: 649–664 pp. Oct 2011. <https://doi.org/10.2217/epi.11.86>

RAPP, P. R. Memory systems in normal and pathological aging. **Current Opinion in Neurology**. V. 7 - N. 4. August 1994. <https://doi.org/10.1097/00019052-199408000-00003>

RAZ, N. Aging of the brain and its impact on cognitive performance: Integration of structural and functional findings. In: Craik, Fergus I. M. (Ed); Salthouse, Timothy A. (Ed). (2000). **The handbook of aging and cognition**, 2nd ed., (pp. 1-90). Mahwah, NJ, US: Lawrence Erlbaum Associates Publishers, ix, 755 pp.

REITER, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **The FASEB Journal**. V. 9 no. 7: 526-533 pp. April 1995.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.9.7.7737461>

RIJPMAN, A., et al. Effects of Souvenaid on plasma micronutrient levels and fatty acid profiles in mild and mild-to-moderate Alzheimer's disease. **Alzheimers Res Ther.**; 7(1): 51. July 2015. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0134-1>

RITCHIE, K. Mild cognitive impairment: an epidemiological perspective. **Dialogues Clin Neurosci**, v 6, 401-408pp. v.6(4); December 2004.

RODRIGUES, H. F. et al. Increased age is associated with epigenetic and structural changes in chromatin from neuronal nuclei. **J Cell Biochem**. 115(4):659-65. Apr. 2014.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24705>

RODRÍGUEZ-RODERO, et al. Aging Genetics and Aging. **Aging Dis**. v 2(3): 186–195 pp. April 2011.

ROLLS, A.; SHECHTER, R.; SCHWARTZ, M. The bright side of the glial scar in CNS repair. **Nature Reviews Neuroscience**. V. 10, 235-241 pp. March 2009. <https://doi.org/10.1038/nrn2591>

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia**: texto e atlas em correlação com a biologia celular e molecular. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SCHELTENS, P. et al. Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: A randomized, controlled trial. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 6, ed. 1, p. 1–10. January 2010.

SCHELTENS, P. et al. Efficacy of Souvenaid in mild Alzheimer's disease: results from a randomized, controlled trial. **Journal of Alzheimer's Disease**. V. 31, N. 1. 225-236 pp. June 2012. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121189>

SCHULTE, E., WITTEKIND, D. Standardization of the Feulgen-Schiff technique Staining characteristics of pure fuchsin dyes; a cytophotometric investigation. **Histochemistry**. v. 91:321-331 pp. Freiburg, Federal Republic of Germany, 1989.
<https://doi.org/10.1007/BF00493008>

SHAH, R. C., et al. The S-Connect study: results from a randomized, controlled trial of Souvenaid in mild-to-moderate Alzheimer's disease. **Alzheimers Res Ther**. V. 5 (6): 59 pp. Nov. 2013. <https://doi.org/10.1186/alzrt224>

SEN, N.; Epigenetic Regulation of Memory by Acetylation and Methylation of Chromatin: Implications in Neurological Disorders, Aging, and Addiction. **Neuromolecular Med**, United States, v. 17, p. 97-110. June 2015. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8306-x>

SETO, E.; YOSHIDA, M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 4, p. a018713, 2014.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>

SEXTON T, SCHOBER H, FRASER P, GASSER S M. Gene regulation through nuclear organization. **Nature Structural & Molecular Biology** 14, November 2007. 1049 – 1055 pp. <https://doi.org/10.1038/nsmb1324>

SHARMA, A. C.; KULKARNI; S. K. Evaluation of learning and memory mechanisms employing elevated plus-maze in rats and mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**; v16 n 1:117-125 pp. Jan 1992. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(92\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0278-5846(92)90014-6)

SHIMOKAWA, I.; TRINDADE, L. S. Dietary Restriction and Aging in Rodents: a Current View on its Molecular Mechanisms. **Aging and Disease**. V. 1: 89–104 pp, 2010.

SOARES, T. J .C. **Sirtuínas**. 2014. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) Instituto de Ciências Abel Salazar – Universidade do Porto. Porto, 2014. Disponível em: <<https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/76505>> Acesso em: novembro de 2016.

SOSA, A. L., et al. Prevalence, Distribution, and Impact of Mild Cognitive Impairment in Latin America, China, and India: A 10/66 Population-Based Study. **PLoS Med**. V. 9 (2): e1001170. February 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001170>

SQUIRE, L. R.; KNOWLTON B.; MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Annu Rev Psychol**. V. 44: 453-495pp. February, 1993. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.44.020193.002321>

STREIT, W. J. Microglia and neuroprotection: Implications for Alzheimer's disease. **Brain Res Brain Res Rev**. V.48: 234–39pp. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.013>

SUSARLA, B. T. S. et al. Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice. **ASN Neuro**. 2014; 6(3): e00143. May, 2014. <https://doi.org/10.1042/AN20130034>

TÉOULE, R.; CADET, J. Radiation-induced degradation of the base component in DNA and related substances - final products, In: J. Hüttermann, W. Köhnlein, R. Téoule and A. J. Bertinchamps. **Effects of Ionizing Radiation on DNA**. Springer-Verlag, New York, NY, 171-203 pp., 1978. https://doi.org/10.1007/978-3-642-81196-8_9

THOMPSON, R. J. Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. **Journal of Neurochemistry**, v. 21, n. 1, p. 19-40, 1973. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb04222.x>

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**. V. Preprint, 1-17 pp, December 2016

UNO, M.; NISHIDA, E. Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. **Npj Aging and Mechanisms of Disease** (2016) 16010. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.10>

VAN DER HORST, A., SCHAVEMAKER, J. M., PELLIS-VAN BERKEL, W. & BURGERING, B. M. The *Caenorhabditis elegans* nicotinamidase PNC-1 enhances survival. **Mechanisms of Ageing and Development**. V. 128, N. 4, April 2007, Pp. 346-349. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.01.004>

VAUCHER, E. et al. Estrogen effects on object memory and cholinergic receptors in young and old female mice. **Neurobiology of Aging**. V. 23, n. 1, January, 87–95 pp. February 2002. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00250-0](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00250-0)

VICENSA, P., et al. Previous Training in the Water Maze: Differential Effects in NMRI and C57BL Mice. **Physiology & Behavior**. V. 67, n. 2, 197–203pp. August, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00059-1)

VILLEPONTEAU, B. The heterochromatin loss model of aging. **Exp. Gerontol**. V.32, 383–394 pp. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(96\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(96)00155-6)

VOGEL-CIERNIA, A.; WOOD, M. A. Examining Object Location and Object Recognition Memory in Mice. **Curr Protoc Neurosci**. 69:8.31.1–8.31.17. Oct. 2014. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>

VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nat Protoc**. V.1, n.2: 848–858 pp. July, 2006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>

WANG, Hengbin et al. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. **Molecular cell**, v. 8, n. 6, p. 1207-1217, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00405-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00405-1)

WATSON, L. A.; TSAI, L. H. In the loop: how chromatin topology links genome structure to function in mechanisms underlying learning and memory. **Curr Opin Neurobiol**. 23;43:48-55. Dec. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.12.002>

WHALLEY, L. J. et al. Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive aging. **Ageing Research Reviews**. V. 3, 369–382 pp. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.05.001>

WHITEHOUSE, P. J., et al. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. **Science**. V. 215, n. 4537, 1237-1239 pp. Mar 1982. <https://doi.org/10.1126/science.7058341>

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World report on ageing and health. Washington (DC): 2015.

WOLFF, G. L.; KODELL, R. L.; MOORE, S. R.; COONEY, C. A. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in A^{vy}/a mice. **The FASEB Journal**, August 1998; V. 12 no. 11 949-957 pp. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.11.949>

WYSS-CORAY, T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. **Nature**, United States, v. 539, p. 180–186, November 2016. <https://doi.org/10.1038/nature20411>

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods in Molecular Biology**. V. 108, 101–106 pp, 1998. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:101>

YANKNER, B. S.; LU, T.; LOERCH, P. The Aging Brain. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**. V. 3:41–66 pp. 2008. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.092044>

YAMASU, K; SENSIN, T. Conservative Segregation of Tetrameric Units of H3 and H4 Histones during Nucleosome Replication. **J Biochem** (1990) 107 (1): 15-20 pp.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122999>

ZONCU, R.; SABATINI, D. M.; EFEYAN, A. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2011 Jan; 12(1): 21–35.
<https://doi.org/10.1038/nrm3025>

ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 199/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 072/15

Projeto Pesquisa: “Avaliação de prejuízo cognitivo e das alterações cromatínicas e epignéticas associadas em neurônios corticais de camundongos idosos, e sua possível modulação por intervenção nutricional”.

Pesquisador Responsável: Alberto da Silva Moraes

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: SOLICITAÇÃO DE ADENDO APROVADA.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 29 de setembro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

APÊNDICE A

Seção LCE

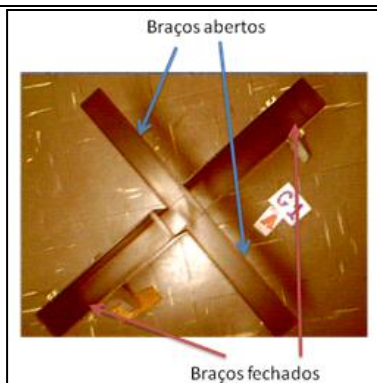
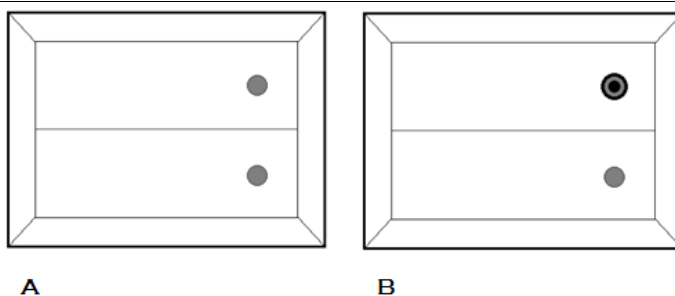


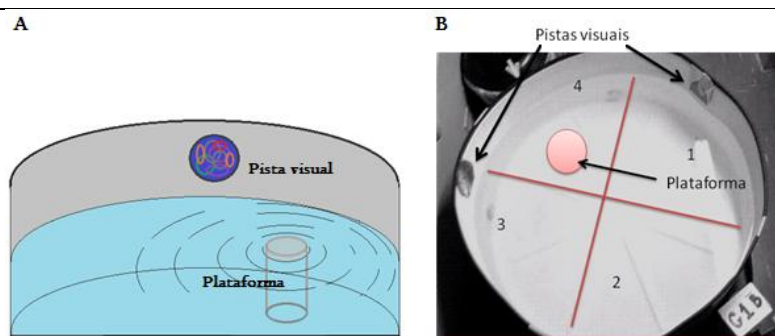
Foto de autoria própria do aparato usado para o teste LCE, mostrando os dois braços abertos e os dois braços fechados

Seção TRO



Esquema de autoria própria com visão superior da caixa onde é realizada a TRO. A: Vista superior da caixa da TRO com dois objetos idênticos em uma das extremidades (primeira exposição). B: Vista superior da caixa da TRO com dois objetos diferentes em uma das extremidades (segunda exposição).

Seção LAM



Tanque de água usado no LAM. A: Esquema de autoria própria com visão de um corte longitudinal do tanque, mostrando a plataforma e uma pista visual nas paredes do mesmo. B: Fotografia de autoria própria, com vista superior do tanque utilizado no LAM, com a representação da divisão do mesmo em quadrantes.