

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
REABILITAÇÃO – PPG-CR**

Anna Aracy Barcelos Ourique

**Efeitos do Huperzine-A sobre o
Desempenho de Memória e
Comportamento Exploratório de Ratos
em um Modelo de Doença de Alzheimer**

Porto Alegre

2013

Anna Aracy Barcelos Ourique

**Efeitos do Huperzine-A sobre o
Desempenho de Memória e
Comportamento Exploratório de Ratos
em um Modelo de Doença de Alzheimer**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Alcyr Alves de Oliveira Jr

**Porto Alegre
2013**

Dedico este trabalho a minha
mãe Menélia Barcelos Ourique (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida, pelas oportunidades a mim proporcionadas e pelas pessoas que colocou no meu caminho.

A minha família pelos valores, ensinamentos, carinho, dedicação e apoio sempre incondicional em todas as minhas decisões, em especial a Fabiana Ourique.

Ao professor Dr Alcyr Oliveira pelo apoio, compreensão, pelos seus ensinamentos e também pela sua amizade.

Ao grupo de pesquisa do professor Dr Alcyr, em especial a Patrícia Santos, Élica Fluck, Rafael Nicolaidis, Giovani Gatto, Arthur Bastos, Amanda Stapenhorst e Kamilla Torquato pelo apoio e ajuda.

Ao Mário e Inês do Biotério da UFCSPA, do laboratório de patologia da UFCSPA a Professora Dra Marilda, Kely, Rose e Teresinha e do laboratório de Biologia Celular da UFCSPA, Isabele e Giuliano que se tornaram grandes amigos.

A minha colega e amiga Letícia pelo carinho, compreensão, disponibilidade de me auxiliar sempre.

A minha amiga Patrícia Klahr pelas suas palavras de incentivo e ajuda incondicional.

A minha amiga e irmã de coração Andréia Gamarra pela amizade para todas as horas.

Aos meus colegas do mestrado pelo convívio, troca de experiências, estudos e amizade.

Enfim a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram a chegar a mais esta conquista meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A doença de Alzheimer (dA) é uma patologia neurodegenerativa, progressiva que, até o momento, não tem perspectiva de cura. O tratamento atual concentra-se na administração de fármacos com ação inibidora da acetilcolinesterase. O uso concomitante de fármacos com ação antioxidante, tem se mostrado uma estratégia promissora. Estudos recentes sugerem que o Huperzine-A (Hup-A) representa esta classe de drogas com potente ação inibitória da acetilcolinesterase, associado a efeito neuroprotetor e grande potencial para o tratamento da dA. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do Hup-A em um modelo animal de dA caracterizado pela depleção de neurônios do núcleo basal magnocelular (NBM). Assim, ratos Wistar machos foram submetidos a cirurgias estereotáticas para produção de lesões do NBM através de infusões de AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate*). Os animais foram distribuídos em 4 grupos : sham+salina, sham+Hup-A, lesão+salina e lesão+Hup-A. Após 21 dias de recuperação pós-cirurgia de lesão, os grupos sham+salina e lesão+salina receberam injeção de solução salina e os animais dos grupos sham+Hup-A e lesão+Hup-A, receberam injeção intraperitoneal de Hup-A (0,2mg/Kg). Trinta minutos após a injeção foram submetidos ao campo aberto (CA) para avaliar a atividade motora, exploração e habituação; logo após passaram pelo teste de reconhecimento de objetos (RO) para avaliação da memória de reconhecimento, seguido pelo teste do labirinto em T-elevado (LTE), para avaliar o desempenho da memória emocional. Os resultados indicaram que o grupo lesão+Hup-A teve mais deambulação CA que os grupos sham+salina e sham+Hup-A. Não ocorreram diferenças significativas entre os grupos no teste de RO. No LTE, foi observado que os animais do grupo lesão+Hup-A retornavam ao braço fechado em tempo menor que o grupo sham+salina. Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados e os cérebros imunoistologicamente examinados para localização da lesão colinérgica. Os resultados observados sugerem que o Hup-A tem potencial influência sobre a memória e comportamento exploratório neste modelo.

Palavras chaves: Alzheimer; Huperzine-A; Memória.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (dA) is a neurodegenerative, progressive pathology, with no definitive cure. The current treatment focuses on the pharmacological inhibition on the action of acetylcholinesterase. The associated use of antioxidant drugs has been shown to be a promising strategy. Recent studies suggest that Huperzine-A (Hup-A) might have a prospective importance for Ad treatment due to its potent action on the inhibition of acetylcholinesterase and neuroprotective effects. The objective of the present study was to investigate the effects of Hup-A in an animal model of Alzheimer's disease characterized by neuronal depletion in the nucleus basalis magnocellularis (NBM). Male Wistar rats were submitted to stereotactic surgery through AMPA infusions into the NBM, producing cholinergic lesions. The animals were distributed into 4 groups: Sham+saline, Sham+Hup-A, Lesion+saline and Lesion+Hup-A. After a 21-day post-surgical recovery, the subjects were intraperitoneally injected with doses of 0.2 mg/kg of Hup-A and after thirty minutes were submitted to the following behavioral assessment tasks: open field test (OF) to assess motor activity, exploratory behavior and habituation to novelty; object recognition test (OR) to assess recognition memory; elevated T-maze test (ETM) to assess emotional memory. The results showed that the Lesion+Hup-A group presented higher motor activity than the Sham+Saline and the Sham+Hup-A groups. There were no differences in OR test. In the ETM test, the lesion+Hup-A group spent less time than Sham+Saline group in the open arm suggesting memory recovery. It was found, in an intragroup comparison, that the animals in the Sham+Hup-A group spent more time into the open arm before leaving to the enclosed arm on the second day. After the behavioral tests, the animals were killed and had their brains histologically examined to verify the extension of the cholinergic lesion. The data suggest that Hup-A has effects on memory and exploratory behavior in this animal model.

Keywords: Alzheimer's, Huperzine A; Memory.

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

Figura 1 - Representação esquemática dos sistemas de projeções colinérgicas do prosencéfalo basal e do tronco cerebral superior em ratos.....14

Figura 2 - A erva chinesa *Huperzia Serrata* (*Qian Ceng Ta*) e a estrutura do Huperzine A.....19

Artigo

Figura 1 – Análise imunohistológica.....53

Figura 2 – Campo Aberto.....54

Figura 3 – Reconhecimento de objetos.....55

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1- Campo Aberto.....	50
Tabela 2- Reconhecimento de objetos.....	51
Tabela 3- Labirinto em T-elevado.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEIs	Inibidores da acetilcolinestrase
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato.
APP	Proteína precursora de amiloide
CA	Campo aberto
CCL	Comprometimento cognitivo leve
ChEIs	Inibidores da Acetilcolinesterase
dA	Doença de Alzheimer
FDA	Food and Drug Administration
Hup-A	Huperzine-A
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação da serotonina
LTE	Labirinto em T- elevado
MS	Ministério da Saúde
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
NBM	Núcleo basal magnocelular
OMS	Organização Mundial da Saúde
RO	Reconhecimento de objetos
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1. DOENÇA DE ALZHEIMER.....	11
2.1.1. Epidemiologia.....	12
2.1.2. Aspectos Neurológicos Envolvidos na Doença de Alzheimer.....	13
2.1.2.1. Sistema colinérgico.....	13
2.1.2.2. Neuropatologia da doença de Alzheimer.....	14
2.1.3. Tratamento.....	16
2.1.3.1. Huperzine A.....	17
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
4 OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo geral.....	26
4.2. Objetivos específicos.....	26
5 ARTIGO	27
6 CONCLUSÃO GERAL.....	56
ANEXOS	
ANEXO 1 – Parecer do CEUA.....	57
ANEXO 2 – Normas e formatação do periódico “Psicologia: Reflexão e Crítica/Psychology”.....	61

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população é evidente na maioria dos países do mundo (OMS, 2012). Este fato pode ser atribuído a diversos fatores, tais como: uma melhora na qualidade de vida das pessoas, adoção de hábitos saudáveis, políticas públicas que visam a manutenção da autonomia e independência da pessoa idosa, facilidade no acesso aos serviços de saúde, políticas previdenciárias e assistência social, qualificação da estratégia de saúde da família, surgimento de novas tecnologias para diagnóstico de doenças, bem como tratamentos farmacológicos e não farmacológicos para as mesmas (Ministério da Saúde, 2010). Porém, com o passar dos anos surgem os estigmas negativos, normalmente associados ao processo natural de envelhecimento, tais como o declínio biológico ocasionalmente acompanhado de um aumento da prevalência de doenças crônicas e incapacitantes (Ministério da Saúde, 2010), sendo as demências umas das mais preocupantes e entre elas a Doença de Alzheimer (dA).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), dados do censo de 2010 mostraram que ocorreu um crescimento na população com 65 anos ou mais. Em 1991 pessoas com esta faixa etária representavam 4,8% da população, passando a 5,9% em 2000 e chegando a 7,4% em 2010 (IBGE, 2011).

No mundo inteiro, cerca de 35,6 milhões de pessoas vivem com demência. Este número deverá dobrar até 2030 (65,7 milhões) e mais que o triplo em 2050 (115,4 milhões). A demência afeta pessoas com mais de meia idade (58%), especialmente em países de baixa e média renda. Em 2050, é provável que esse número avance para mais de 70% (OMS, 2012).

Tratar e cuidar de pessoas com demência atualmente custa ao mundo mais de 604 bilhões de dólares por ano. Isso inclui o custo da prestação de cuidados de saúde e sociais, bem como a redução ou perda de renda de pessoas com demência e seus cuidadores (OMS, 2012).

A dA é uma doença que apresenta vários desafios desde seu diagnóstico, tratamento e principalmente quanto a sua etiologia. Pesquisadores tem mantido as suas atenções e estudos voltados para a descoberta de fatores causadores e achados de novos fármacos que possam melhorar ou controlar a evolução desta enfermidade. Os fármacos disponíveis até o momento, como Donepezil, Rivastigmina e Galantamina, segundo uma revisão realizada por Pepeu & Giovannini (2009), não apresentam ações farmacológicas além da inibição da acetilcolinesterase que podem desempenhar um papel importante na sua eficácia terapêutica, porém tratam a doença de forma paliativa. Citam ainda a importância do desenvolvimento de novos anticolinesterásicos e particularmente os chamados multifuncionais, visto que a etiologia da dA abrange múltiplos mecanismos. Neste contexto, o desenvolvimento da presente pesquisa tem por foco principal avaliar os efeitos

do Huperzine-A (Hup-A) como uma alternativa ou terapia complementar ao tratamento da dA. Esta é uma substância de origem natural, utilizada na tradicional medicina chinesa, para o melhoramento da memória dos indivíduos. Isto deve-se, segundo alguns relatos, as suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e anticolinesterásicas, com poucos efeitos colaterais, indicando ser uma substância relevante, pois pode atuar em múltiplos alvos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

A doença de Alzheimer foi descrita pela primeira vez em 1906 pelo neurologista alemão Alois Alzheimer. Esta permanece sem perspectiva de cura até os dias atuais, e com uma alta prevalência e predominância principalmente no sexo feminino. A dA é uma doença neurodegenerativa progressiva, com duração média de 8,5 anos entre o início dos sintomas clínicos e a morte do indivíduo (Fox & Alder, 2001; Francis et al., 1999). Caracteriza-se pelo empobrecimento progressivo dos processos de memória e atenção com distintivas consequências sobre a emocionalidade (Woods, 2001; Foldi, 2002), levando a um declínio das habilidades funcionais e sociais (Fox & Alder, 2001). A deterioração das memórias de curto e longo prazo são características iniciais, seguida de afasia, apraxia, agnosia ou um distúrbio do movimento depois de vários anos de acometimento pela doença (Fox & Alder, 2001; Heun et al., 2011). Uma das supostas etiologias é a “hipótese colinérgica” (Francis et al., 1999) a qual é descrita como a perda de terminações colinérgicas nos córtices frontais, parietais e hipocampo.

Esta doença apresenta características clínicas e patológicas que podem variar individualmente com relação à idade de início e padrão de comprometimento cognitivo (Braak & Braak, 1991). Fatores de risco como a baixa escolaridade, traumatismo craniano associado à perda de consciência, sexo feminino, depressão, diabetes mellitus, hipertensão arterial, fumo, hiperinsulinemia, inatividade física, fibrilação arterial, dieta rica em gorduras, fatores genéticos, podem estar relacionados a uma pré-disposição à doença, sendo o principal fator a idade avançada (Ritchie & Lovestone, 2002; Adams, 2008; Williams et al., 2010).

Embora nos últimos anos as pesquisas sobre a dA tenham avançado, principalmente no que tange os conceitos fisiopatológicos da doença e critérios para o diagnóstico da mesma, ainda restam desafios fundamentais no que se refere ao seu tratamento. A alta incidência, a falta de modificadores da doença ou terapias preventivas que poderiam retardar o seu aparecimento ou, até mesmo, influenciar significativamente na

fisiopatologia da dA, resultam em um enorme problema para os indivíduos acometidos, suas famílias e cuidadores (Hampel et al., 2011).

2.1.1. Epidemiologia

Estima-se existirem atualmente cerca de 18 milhões de pessoas portadoras da dA em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (2011) estima que este número dobrará até 2025.

Segundo relatório da Associação de Alzheimer (2011), a dA é a sexta maior causa de mortes nos Estados Unidos e é a quinta principal causa de morte em americanos com idade igual ou acima de 65 anos. Para o ano de 2050, estão previstos de 11 a 16 milhões de portadores dessa doença. Embora outras causas de morte estejam diminuindo, mortes em decorrência da dA estão aumentando drasticamente. Entre 2000 e 2008 (dados preliminares citados pela Associação de Alzheimer), algumas doenças apresentaram uma queda em suas taxas de mortalidade, tais como: doenças cardíacas, 13%; AVC, 20%; câncer, 8%. No entanto, as mortes ocasionadas pela dA aumentaram 66% nesse período. Segundo dados da *Alzheimer's Association American* (2011), o aumento da expectativa de vida e conseqüentemente o aumento no número de idosos, em todos os grupos raciais e étnicos, também afetará de forma significativa o número de pessoas com a dA.

O aumento previsto em casos de dA é claramente atribuível ao aumento do número de pessoas idosas, principalmente em países de baixa e média renda. Em países desenvolvidos, o número de pessoas afetadas por demência aumentará substancialmente com o envelhecimento geral da população, sendo a forma mais comum de demência de início tardio é a dA, representando 50-75% do número total de indivíduos com demência (Heun et al., 2011). Tendo em vista o exposto a cima, estima-se que o número de pessoas com demência aumentará em torno de 80% a 190% até o ano de 2040 na Europa, América do Norte e na região do Pacífico Ocidental. Enquanto na América Latina, Índia, China, África do Norte e Oriente Médio, um aumento em torno de 300% está previsto (Hampel et al., 2011).

No Brasil estes dados ainda são restritos, pois poucos estudos foram realizados e todos foram desenvolvidos no estado de São Paulo, com exceção de um no Rio Grande do Sul, mas percebe-se que a incidência dA é semelhante aos dados mundiais (Vieira & Caixeta, 2012). Um destes estudos foi o de Tascone e colaboradores (2008) que acompanharam 113 pacientes diagnosticados em um ambulatório de demência de um hospital universitário de São Paulo, onde a dA teve uma incidência de 62,8% dos pacientes, a demência vascular, em 8,8% e outros tipos de demências em 14,2%.

Esses dados mostram um sério motivo de preocupação, pois indicam que a dA terá, em breve, um impacto significativo na sociedade e pode ser considerada como uma epidemia moderna. Portanto, a necessidade urgente de prevenção, medidas diagnósticas rápidas e terapêuticas eficientes são de extrema importância no controle do impacto desta doença devastadora (Hampel et al., 2011).

2.1.2 Aspectos Neurológicos Envolvidos na da Doença de Alzheimer

2.1.2.1. Sistema colinérgico

Há dois sistemas modulatórios colinérgicos de projeções difusa no encéfalo, o pontomesencefálico, e o outro chamado complexo do prosencéfalo basal. Este é um “complexo” porque os neurônios colinérgicos estão dispersos entre diversos núcleos relacionados entre si e localizados no centro do telencéfalo, medial e ventralmente aos núcleos da base. O mais conhecido deles é o núcleo basal de Meynert, que provê a maior parte da inervação colinérgica para o neocórtex. O complexo do prosencéfalo basal também pode ter um papel especial na cognição, atenção, aprendizagem e na formação da memória (Noback, Strominger, Demarest & Ruggiero, 2005; Bear, Connors & Paradise, 2008). Na demência moderada e avançada, intensificam-se as perdas neuronais e surgem disfunções sinápticas e neuroquímicas, afetando, sobretudo, os sistemas colinérgico, serotoninérgico e glutamatérgico. Essa heterogeneidade biológica está correlacionada com o tipo e a intensidade das manifestações psíquicas e cognitivas (Nobackl, Strominger, Demarest & Ruggiero, 2005). Portanto, a dA cursa com redução da função colinérgica central, principalmente em áreas límbicas e temporo-parietais. Observa-se degeneração das projeções colinérgicas oriundas do prosencéfalo basal em direção à formação hipocampal, bem como redução da atividade da enzima colina-acetiltransferase, responsável pela síntese de acetilcolina. Tal disfunção acomete predominantemente o nível pré-sináptico, com relativa preservação da neurotransmissão pós-sináptica (partindo do hipocampo em direção às demais estruturas temporais, límbicas e neocorticais) (Noback, Strominger, Demarest & Ruggiero, 2005; Forlenza, 2005; Wasxman, 2010).

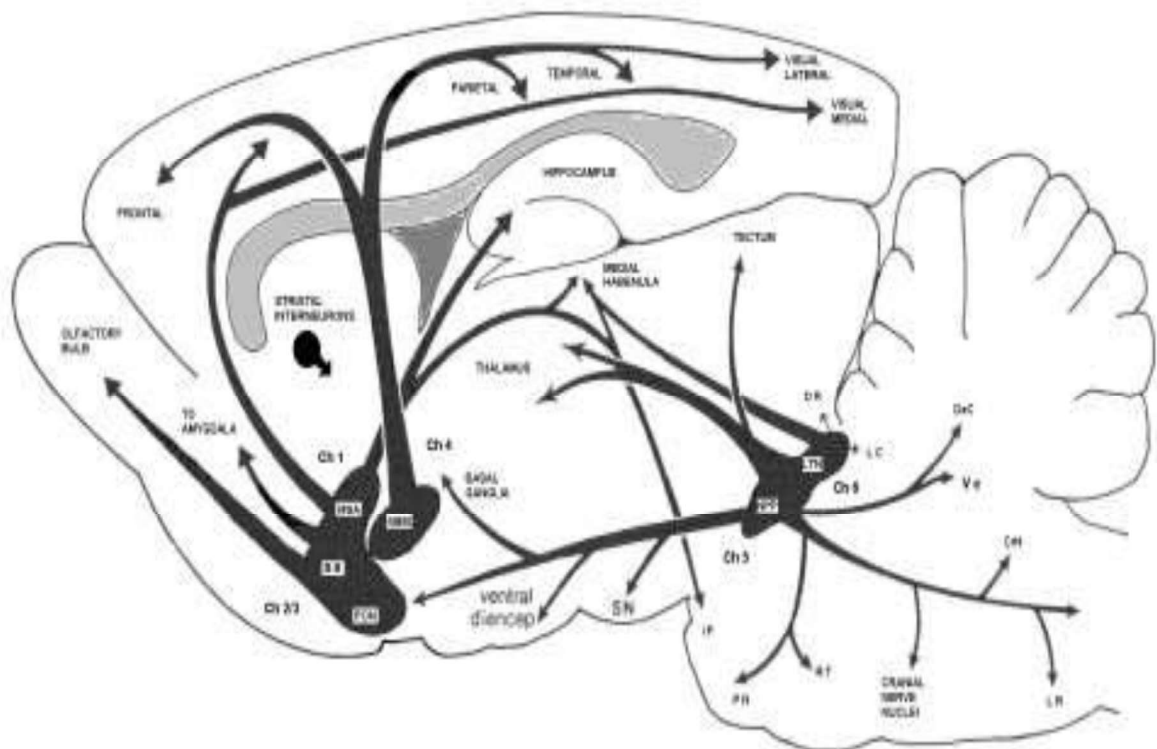


Figura 1 – Representação esquemática dos sistemas de projeções colinérgicas do prosencéfalo basal e do tronco cerebral superior em ratos. Abreviações: MSA (área septal medial), BB (banda de Broca), NBM (núcleo basal magnocelular), PON (praeopticos núcleo), LTN (núcleo tegmentar lateral), NPP (núcleo pedunculopontino). Adaptado de Butcher, Oh e Woolf, 1993. Ch1 para Capítulo 6 nomenclatura referem-se colinérgica subdivisões de acordo com Mesulam, Mufson, Levey e Wainer, 1983.

2.1.2.2. Neuropatologia da doença de Alzheimer

Características patológicas comuns à doença incluem deposição extracelular de proteína beta-amiloide, derivadas da proteína precursora de amiloide (APP), em placas senis, e o aparecimento de emaranhados neurofibrilares intracelulares (Bear, Connors & Paradise, 2008). A microscopia eletrônica mostrou que a maioria dos emaranhados é formada por filamentos helicoidais pareados, longas proteínas fibrosas trançadas umas sobre as outras. Sabe-se que esses filamentos são formados por uma proteína associada aos microtúbulos, a proteína tau, que funciona como uma ponte entre os microtúbulos, assegurando um trajeto paralelo entre si, ao longo do axônio. Na dA, a proteína tau desprende-se dos microtúbulos e acumula-se no soma celular (Bear, Connors & Paradise, 2008). Essa alteração nos microtúbulos causa o enrugamento do axônio, impedindo o fluxo normal da informação nos neurônios afetados (Bear, Connors & Paradise, 2008). Devido à importância da proteína tau na manutenção da estabilidade e da

homeostase neuronal, sua hiperfosforilação leva a uma cascata de eventos neuronais que acaba por causar a morte neuronal (De Paula & Forlenza, 2012).

Essas mudanças na proteína tau têm atenções direcionadas a um possível acúmulo da proteína amilóide no encéfalo. O consenso na maioria dos estudos atuais é de que a secreção anormal de amilóide pelos neurônios é o primeiro passo para o processo que desencadeia a formação dos emaranhados neurofibrilares e a demência (Bear, Connors, Paradiso, 2008). A excessiva produção de proteína β -amilóide pode levar a estresse oxidativo, apoptose mitocondrial e, consequentemente, provocar estado de neurotoxicidade desencadeando a morte celular (Selkoe, 1996; Wang & Tang, 2001).

Atualmente, são também observadas alterações focais em pessoas com demência, tais como a atrofia do lobo temporal medial, incluindo o alargamento do volume ventricular em torno do hipocampo, e atrofia do hipocampo e córtex entorrinal, sendo que estes eventos correlacionam a dA com a gravidade clínica (Scheltens et al., 2002; Duara et al., 2008; Ridha et al., 2007). Também, a perda de volume cerebral total em pessoas com dA é maior e ocorre mais rapidamente do que em pessoas com comprometimento cognitivo leve (CCL) (Dekosky et al., 2011). O uso de biomarcadores, tem sido propostos para facilitar a previsão precoce, diagnóstico e tratamento da dA, bem como o monitoramento da progressão da doença e resposta ao tratamento (Hampel et al., 2011). Tais biomarcadores estariam relacionados com a produção de β -amilóide e proteína tau (Hampel et al., 2008). Porém, atualmente, não se preconiza o uso de marcadores biológicos na rotina diagnóstica, por haver várias razões, entre elas, a necessidade de mais estudos para assegurar que os critérios associados a tais marcadores sejam apropriadamente delineados (Caixeta, Peleja & Barros, 2012).

Além da observável deterioração cognitiva, é saliente também a progressiva perda neuronal em estruturas do prosencéfalo basal com redução no número de neurônios colinérgicos localizados no núcleo basal de Meynert (Braak & Braak, 1991). No cérebro de roedores, a estrutura correspondente é o núcleo basal magnocelular (NBM), que envia projeções colinérgicas para outras partes do cérebro, como o neo-córtex e a área septal medial com ligações para o hipocampo, bulbo olfatório e córtex visual medial (Bartus & Emerich, 1999; Braak & Braak, 1991). Excitotoxinas como o AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate*) têm sido usadas para produzir lesões e gerar modelos experimentais de depleção colinérgica localizada (Muir, Everitt, Robbins, 1994). Estes modelos permitem a avaliação de fenômenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais comparados aos eventos típicos da patologia em humanos (Ferreira & Ferreira, 2003). O AMPA atua em receptores glutamatérgicos destruindo corpos celulares em um processo de excitotoxicidade no qual ocorre uma maciça e sustentada

despolarização em células pré-sinápticas (Barker & Dunnet, 1999). Desta maneira, as membranas celulares e suas bombas de cálcio entram em colapso e perdem a capacidade de homeostase (Casamenti et al., 1998). Assim, as células morrem por excesso de estimulação (Oliveira, Hodges & Rezaie, 2003).

O AMPA causa a morte dos neurônios colinérgicos existentes no NBM sem disseminar destruição colinérgica em outras estruturas nem de outros tipos celulares (Waite et al., 1994). Como consequência, animais que tiveram o NBM lesionados por AMPA mostram dificuldades em armazenar memórias recentes, como observado no labirinto em T-elevado (Oliveira, 2003) e em outros aparatos de testes que demonstrem atributos funcionais de memória e aprendizagem (Muir et al., 1993; Waite et al., 1994).

2.1.3. Tratamento

Estudos tem dirigido para o desenvolvimento de tratamentos preventivos ou no atraso do início sintomático da dA (Fox & Alder, 2001; Adams, 2008). Várias estratégias terapêuticas são baseadas nos mecanismos neurodegenerativos envolvidos na doença. Por exemplo, a observação de um déficit colinérgico no córtex cerebral de pacientes com dA levou ao desenvolvimento do primeiro inibidor da colinesterase, a tacrina (Fox & Alder, 2001; Adams, 2008). Em pacientes com dA, os déficits colinérgicos estão associados à diminuição da função cognitiva. O tratamento com inibidores da acetilcolinesterase (ChEIs) aumenta os níveis do neurotransmissor acetilcolina (Small, 2012). Estudos clínicos demonstraram que ChEIs tem um benefício limitado, de leve a moderado, no tratamento de sintomas clínicos na dA. Ao potencializar a acetilcolina, essas substâncias podem induzir efeitos colaterais periféricos, sobre tudo sobre os aparelhos gastroentestinal e cardiovascular, o que leva a interrupção do tratamento por alguns pacientes (Fox & Alder, 2001; Adams, 2008; Caixeta, 2012; Small, 2012). Três inibidores da colinesterase foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), agência reguladora de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos, para o tratamento de demência leve a moderada: Donepezil, Galantamina e Rivastigmina (Fox & Alder, 2001; Adams, 2008). Caixeta (2012), relata que após quatorze anos do desenvolvimento do primeiro anticolinesterásico, parece oportuno reavaliar os processos farmacológicos de inovação no campo da pesquisa de dA. Cita que os tratamentos sintomáticos tem mostrado ser parcialmente bem sucedidos, porém, há várias falhas em termos de desenvolvimento de terapias modificadoras da doença.

Também são usados antidepressivos conhecidos como inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), que podem ser particularmente eficazes no alívio de depressão, irritabilidade, inquietação associados à dA. Estudos preliminares com esse tipo

de fármaco, tais como citalopram, fluoxetina ou paroxetina, mostraram redução de irritabilidade (Devanand, 1997; Flint & Van Reekum, 1998) e nenhum efeito secundário sobre a disfunção cognitiva (Cassano et al., 2002).

O paciente com dA necessita também de um acompanhamento interdisciplinar, com intervenções nas áreas de nutrição, fisioterapia, terapia ocupacional, enfermagem, psicologia, médica e, às vezes na área social. Estas intervenções são necessárias no intuito de controlar todas as comorbidades que afetam o paciente, tais como a instabilidade postural e quedas, imobilidade e suas complicações, incontinência urinária, distúrbios da deglutição, distúrbios comportamentais, entre outros (Lakhdari, 2012).

Nesta perspectiva de descobrir novas substâncias que auxiliem no tratamento dos sintomas e contenham a evolução da dA, é observado o uso concomitante de fármacos com supostas ações antioxidantes de origem vegetal, como o ginkgo biloba, a epicatequina oriunda do chá-verde e o huperzine A (Hup-A), oriundo da erva *Huperzia serrata*. Estudos recentes sugerem que o Hup-A representa uma inovadora perspectiva para o tratamento da dA com potente ação inibidora da acetilcolinesterase, sem causar hepatotoxicidade e com poucos efeitos adversos, apresentando também efeitos antioxidantes e em outros estudos indicam poderoso efeito neuroprotetor (Liang & Tang, 2004; Zhang & Tang, 2006; Shi et al., 2012).

2.1.3.1.Huperzine-A

A medicina tradicional chinesa (MTC) é praticada no cuidado à saúde há mais de 2000 anos. Muitos compostos farmacológicos ativos com base de ervas chinesas, tem sido identificados para o tratamento de várias doenças, incluindo diabetes, infecções microbianas, alergias, inflamações e câncer. Nos últimos anos cientistas tem estudado novos compostos isolados a partir de muitas ervas as quais melhoram a demência, com menos efeitos secundários do que medicamentos convencionais e que são considerados promissores no tratamento da dA (Wu, Chen, Jinn, 2011). Um deles é o Huperzine (Hup-A) um alcalóide isolado da erva *Huperzia serrata*, (figura 2), usado na MTC para tratamento de febres, inchaços, hipertensão e alterações de memória. A origem da planta, tradicionalmente chamada de Qian Ceng Ta ("pagoda de mil camadas") tem um segundo nome na China, Jin Bu Huan, que significa "mais valioso do que o ouro", uma definição aplicada a plantas com propriedades analgésicas (Zangara, 2003).

Estudos revelam que o Hup-A é um potente, reversível, seletivo e bem tolerado inibidor da acetilcolinesterase (Liang & Tang, 2004; Zhang & Tang, 2006), com

capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Wang & Tang, 1998). Os inibidores da acetilcolinesterase aumentam a quantidade de ACh na fenda sináptica neuronal inibindo a enzima responsável pela hidrólise da ACh e, conseqüentemente, melhorando a transmissão neuronal (Zangara, 2003). Também apresenta efeitos neuroprotetores (Zhang & Tang, 2006), atenuando a apoptose, reduzindo perdas de neurônios e invertendo o padrão de expressão de proteínas relacionadas a apoptose induzida pela proteína beta-amilóide no córtex e no hipocampo (Wang & Tang, 2001). Hup-A também pode reduzir a morte celular neuronal causada por neurotoxicidade induzida pelo glutamato (Ved et al., 1997; Zhang & Tang, 2006). O glutamato ativa receptores n-metil-D-aspartato e aumenta os íons cálcio nos neurônios, que em níveis tóxicos pode matar as células (Gordon et al., 2001).

Hup-A causou um aumento significativo nos níveis ACh em cérebro de ratos. Após 6h da administração de Hup-A nas doses 0,3, 0,5 ou 2 mg/kg os ratos demonstravam aumento de ACh no cérebro. (Tang et al 1989). O efeito do Hup-A para a elevação do grau de ACh demonstrou seletividade regional. O aumento máximo foi observado no córtex frontal e parietal após 60 minutos, intermediário no hipocampo em 30 minutos, em 5 minutos na medula oblonga após sua administração oral (Tang et al., 1989; Tang et al., 1994; Wang & Tang, 1998; Wang et al., 1988).

Estudos toxicológicos indicam que Hup-A apresenta poucos efeitos adversos em relação a outros anticolinesterásicos, como fisostigmina e tacrina (Ved et al., 1997). Além disso, em um trabalho realizado por Liang & Tang (2004), foi verificado que o Hup-A aumentou os níveis de acetilcolina cortical em comparação com donepezil e rivastigmina demonstrando também ação mais prolongada e efeitos colaterais igualmente menores.

Gao et al. (2009) demonstraram em seus estudos que o Hup-A pode proteger as mitocôndrias contra o acúmulo de proteína β -amilóide, ao menos parcialmente, preservando a integridade da membrana e melhorando o metabolismo energético. Estes efeitos diretos sobre as mitocôndrias pode ampliar ainda mais as funções colinérgicas.

Em estudos recentes Shi et al. (2012) evidenciaram que o Hup-A também pode melhorar de forma significativa o stress oxidativo, déficits cognitivos e inibir a cascata apoptótica induzida pela exposição aguda à hipóxia hipobárica em ratos. A melhora na cognição, poderia ser explicada pela restauração de anormalidades colinérgicas e neuroproteção no hipocampo cerebral, onde projeções de neurônios colinérgicos são importantes no aprendizado e na memória. Ainda, o Hup-A aumentou os mecanismos antioxidantes e atuou como agente anti-apoptótico, aumentando assim a capacidade de sobrevivência neuronal em condições de stress.

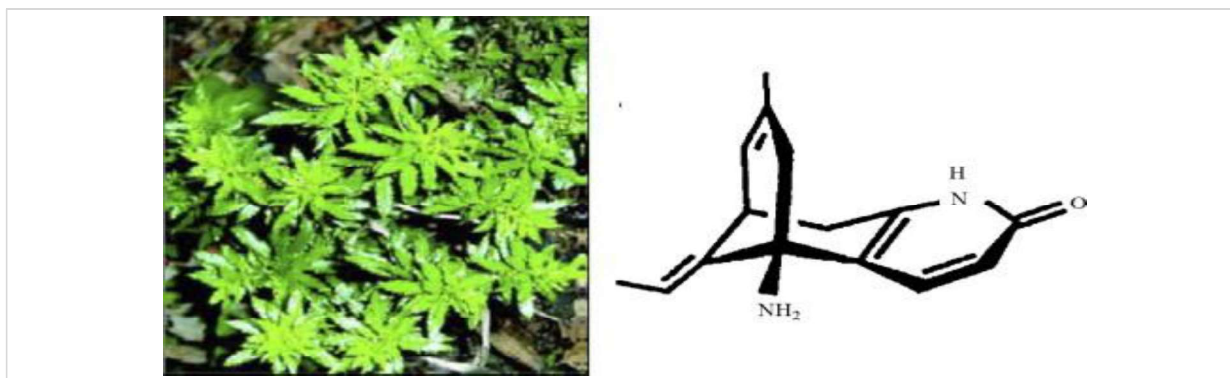


Figura 2. A erva chinesa *Huperzia Serrata* (*Qian Ceng Ta*) e a estrutura do Huperzine A. (Zhang et al., 2008).

Conforme os estudos supracitados pode-se inferir que algumas substâncias extraídas de ervas da tradicional medicina chinesa, como Hup-A, tem efeitos comprovados de melhora na função colinérgica, efeitos neuroprotetores como a regulação do metabolismo da proteína precursora de amilóide de (APP), estresse oxidativo, apoptose mitocondrial e efeito anti-inflamatório. Sendo assim, podendo não só contribuir para a melhora dos sintomas, mas também retardar a progressão da dA.

Tendo em vista a relevância da descoberta de novas moléculas para o tratamento da dA, o objetivo principal deste estudo foi investigar o efeito do Hup-A em um modelo experimental da dA. Para tanto, foi avaliada a ação positiva do Hup-A sobre o desempenho de memória e comportamento exploratório de ratos Wistar com lesões no NBM.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams AC. Mayo Clinic Essential Neurology. Mayo Foundation for Medical Education and Research. USA .2008; 8, 199-204.

Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2011; 7, 208-244.

Barker RA & Dunnett SB. Neural repair, transplantation and rehabilitation. Hove: Psychology Press Ltd. 1999.

Bartus RT & Emerich DF. Cholinergic markers in Alzheimer disease. *Journal of American Medical Association*. 1999; 15(282), 2208-22.

Bear MF, Connors BW, Pardiso MA. Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso, 3º ed. Ed. Artmed, Porto Alegre. 2008; 2, 36.

Braak H & Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*. 1991; 82(4), 239-259.

Caixeta L. Tratamento da Doença de Alzheimer – da magia à evidência in Caixeta L. e colaboradores. Doença de Alzheimer. 1ºed, Ed. Artmed, Porto Alegre. 2012; 24, 369-391.

Caixeta L, Peleja AAC., Barros N.M. Novos critérios diagnósticos e marcadores biológicos da Doença de Alzheimer in Caixeta, L. E colaboradores. Doença de Alzheimer. 1º ed, Ed. Artmed, Porto Alegre. 2012; 6, 83-95.

Casamenti F, Prosperi C, Scali C, Giovannelli L & Pepeu G. Morphological, biochemical and behavioural changes induced by neurotoxic and inflammatory insults to the nucleus basalis. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 1998; 16 (7-8), 705-714.

Cassano GB, Puca F, Scapicchio PL, Trabucchi M & Italian Study Group on Depression in Elderly, P. (2002). Paroxetine and fluoxetine effects on mood and cognitive functions in depressed nondemented elderly patients. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2002; 63(5), 396-402.

Dekosky ST, Carrilo M, Phelps C, Knopman D, Petersen R, Frank R, Schenk D, Masterman D, Siemers E, Cedarbaum JM, Gold M, Miller DS, Morimoto BH, Khachaturian A, Mohs R. Revision of the criteria for Alzheimer's disease: A symposium. *Alzheimer's & Dementia*. 2011; 7, 1-12.

De Paula VJR, Forlenza OV. Neurobiologia da Doença de Alzheimer in Caixeta, L. E colaboradores. *Doença de Alzheimer*. 1º ed, Ed. Artmed, Porto Alegre. 2012; 2, 31-45.

Devanand DP. Behavioral complications and their treatment in Alzheimer's disease. *Geriatrics*. 1997; 52(2), S37-S39.

Duara R, Loewenstein DA, Potter E, Appel J, Greig MT, Urs R, Shen Q, Raj A, Small B, Barker W, Schofield E, WuY, Potter H. Medial temporal lobe atrophy on MRI scans and the diagnosis of Alzheimer disease. *Neurology*. 2008; 71:1986–92.

Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model: Historic and conceptual revision. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2003; 18, 1-3.

Flint AJ & Van Reekum R. The pharmacologic treatment of Alzheimer's disease: a guide for the general psychiatrist. *Canadian Journal of Psychiatry*. 1998; 43(7), 689-697.

Foldi NS, Lobosco JJ & Schaefer LA. (2002). The effect of attentional dysfunction in Alzheimer's disease: theoretical and practical implications. *Seminars in Speech and Language*. 2002; 23(2), 139-150.

Forlenza VO. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Revista de Psiquiatria Clínica*, São Paulo. 2005; vol.32, 3.

Fox CM & Alder RN. Mecanismos Neurais do Envelhecimento in Cohen, H. *Neurociências para Fisioterapeutas*. 2º ed., Ed. Manole, Barueri, SP. 2012; 17, 344.

Francis PT, Palmer AM, Snape M & Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal Neurologic Neurosurgery Psychiatry*. 1999; 66:137–47.

Gao X, Zheng CY, Yang L, Tang XC & Zhang HY. Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against β - amyloid peptide. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 46, 1454-1462.

Gordon R K, Nigan S V, Weitz JA, Dave JR, Doctor BP, Ved HS.. The NMDA receptor ion channel: a site for binding of Hup-A. *Journal of Applied toxicology*. 2001; 21, (suppl. 1), 47-51.

Hempel H, Bürger K, Teipel SJ, Bokde AL, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2008; 4(1):38-48.

Hempel H, Prvulovic D, Teipel S, Jessen F, Luckhaus C, Frölich L, Riepe, MW, Dodel R, Leeyhe T, Bertram L The future of Alzheimer's disease: The next 10 years. *Progress in Neurobiology*. 2011; 95, 718-728.

Heun R, Shoenf D, Potluri R, Natalwala A. Alzheimer's disease and co-morbidity: Increased prevalence and possible risk factors of excess mortality in naturalistic 7- year follow-up. *European Psychiatry*. 2011; 1-9.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?ed_noticia=1866&ed_pagina=1. Acessado em: 17/02/2013.

Lakhdari S, Manejo clínico das principais comorbidades do idoso com Doença de Alzheimer in Caixeta, L. e colaboradores. *Doença de Alzheimer 1º ed*, Ed. Artmed, Porto Alegre. 2012; 22, 337-352.

Liang YQ & Tang XC. Comparative effects of de Hup-A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholinesterase activity in rats. *Neuroscience Lettrs*. 2004; 361, 56-59.

Ministério da Saúde (2010). *Atenção à Saúde da Pessoa Idosa e Envelhecimento – Série Pactos pela Saúde-2006*, vol.12, Brasília, DF.

Acesso 16/02/2013 em portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/volume12.pdf.

Muir JL, Everitt BJ & Robbins TW. AMPA-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain: a significant role for the cortical cholinergic system in attentional function. *Journal of Neuroscience*. 1994;14(4), 2313-2326.

Muir JL, Page K J, Sirinathsinghji DJ, Robbins TW. & Everitt BJ. Excitotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons: effects on learning, memory and attention. *Behavioural Brain Research*. 1993; 57(2), 123-131.

Noback CR, Stroming NL, Demarest RJ., Ruggiero DA. The Human Nervous system: Structure and Function. 2005. 6th ed., Humana Press.

Oliveira AA, Hodges H & Rezaie P. Excitotoxic lesions of the rat basal forebrain with S-AMPA: consequent mineralization and associated glial response. *Exp. Neurology*. 2003; 179(2), 127-38.

Oliveira AA. Stem cell graft effects following unilateral cholinergic depletion. 322 paginas, tese doutorado, University of London, Institute of psychiatry, King's College, de Crespigny, London, 2003.

Pepeu G, Giovannini MG. Cholinesterase inhibitors and beyond . *Current Alzheimer Research*. 2009; 6(2), 86-96.

Ridha BH, Barnes J, Van de Pol LA, Schott JM, Boyes RG, Siddique MM, Rossor MN, Scheltens P, Fox NC. Application of automated medial temporal lobe atrophy scale to Alzheimer disease. *Archives Neurology*. 2007; 64:849–54.

Ritchie K, Lovestone, S. As Demências, *Lancet*. 2002; 360 (9347): 1759-66.

Scheltens P, Fox N, Barkhof F, De Carli C. Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion. *Lancet Neurology*. 2002; 1:13–21.

Selkoe D.J. Amyloid beta protein and genetic of Alzheimer's disease. *Journal Biological Chemistry*. 1996; 271, 18295-18298.

Shi Q, Fu J, Di G, Yan H, Ran J, Liu Z, Wei J, Diao T, Lu Y. Huperzine A Ameliorates Cognitive Deficits and Oxidative Stress in the Hippocampus of Rats Exposed to Acute Hypobaric Hypoxia. *Neurochemical Research*. 2012; 37, 9, 2042-2052.

Small, G. Pharmacological Rationale for cholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*. 2012; 33, s1-s38.

Tang XC, De Sarmo P, Sugaya K, Giacobini E. Effect of huperzine A, a new cholinesterase inhibitor on the central cholinergic system of the rat. *Journal Neuroscience. Research*. 1989; 24, 276-285.

Tang XC, Kendel GH, Kozikowski AP, Hanin I. Comparison of the effects of natural and synthetic huperzine A on rat brain cholinergic function in vitro and in vivo. *Journal Ethnopharmacology*. 1994; 44, 147-155.

Tascone LS, Marques RCG, Pereira EC, Bottino C. Characteristics of patients assisted in an ambulatory of dementia from university hospital. *Arq Neuropsiquiatrica*. 2008; 66(3), 631-5.

Vieira RT, Caixeta L. *Epidemiologia da Doença de Alzheimer in Caixeta, L. e colaboradores. Doença de Alzheimer*. 1º ed, Ed Artmed, Porto Alegre. 2012; 4, 57-70.

Ved HS, Koenig ML, Dave JR, Doctor BP. Hup-A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. *Neuroreport*. 1997;8, 963-968.

Waite JJ, Chen AD, Wardlaw ML & Thal LJ. Behavioral and biochemical consequences of combined lesions of the medial septum/diagonal band and nucleus basalis in the rat when ibotenic acid, quisqualic acid, and AMPA are used. *Experimental Neurology*. 1994; 130(2), 214-229.

Wang H & Tang XC. Anticholinesterase effects of Hup-A, E2020, and tacrine in rats. *Acta Pharmacology*. 1998; 19, 27-30.

Wang YE, Fend J, Lu WH, & Tang XC. Pharmacokinetics of huperzine A in rats and mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1988; 9, 193-196.

Wang R, Zhang HY & Tang XC. Hup-A attenuates cognitive dysfunction and degeneration caused by β -amyloid protein-(1-40) in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 421, 149-156.

Wang ZF, Tang LL, Yan H, Wang YY & Tang XC. Effectos of Hup-A on memory deficits and neurotrophic factors production after transcent cerebral ischemia and reperfusion in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2006; 83, 603-611.

Wasxman SG. *Clinical Neuroanatomy*, A Lance Medical Book, New York, USA. 2010; ed. 26, 3, 29.

Williams JW,. Plassman BL, Burke J, Holsinger T, Benjamin S. Preventing Alzheimer's Disease and Cognitive Decline, Evidence Report/Technology Assessment. 2010; 1-727.

Woods RT. Discovering the person with Alzheimer's disease: cognitive, emotional and behavioural aspects. *Aging & Mental Health*. 2001;5(1), 7-16.

Word Health Organization (2011). Disponível em: www.who.int/en. Acessado em: 07/07/2011.

Word Health Organization (2012). Disponível em: www.who.int/en. Acessado em: 10/10/2012.

Wu TY, Chen CP, Jinn TR. Tradicional Chinese Medicines and Alzheimer's Disease. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2011; 50, 131-135.

Zhang HY & Tang XC. Neuroprotective effects of Hup-A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Pharmacological Sciences*. 2006; 27(12), 619-625.

Zangara A. The psychopharmacology of Hup-A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*. 2003; 75(3):675-86.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

O objetivo principal do presente estudo consistiu em investigar os efeitos do Huperzine-A sobre a memória, atividade motora e o comportamento exploratório em um modelo animal da doença de Alzheimer.

4.2. Objetivos específicos

Verificar os efeitos do Hup-A sobre a memória e comportamento exploratório em um modelo animal de dA no campo aberto.

Investigar os efeitos do Hup-A sobre a memória e comportamento exploratório em um modelo de dA no reconhecimento de objetos.

Observar os efeitos do Hup-A sobre a memória e comportamento exploratório em um modelo animal de dA no T-elevado.

5. Artigo

**Efeitos do Huperzine-A sobre o Desempenho de Memória e Comportamento
Exploratório em Ratos em um Modelo de Doença de Alzheimer
Effects of huperzine-A on memory Performance and Exploratory Behavior in
Rats in a Model of Alzheimer's Disease**

(O artigo será submetido ao periódico **Psicologia: Reflexão e Crítica**, Artigo completo)

Anna A.B. Ourique; Élide Fluck Pereira Neto; Letícia D. Bertuzzi; Patrícia S. Klahr; Patrícia Santos da Silva; Paulo G. M. Lopes; Alcyr A. Oliveira Junior.

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brasil

Autor para correspondência: Alcyr Alves de Oliveira Jr., PhD

Departamento de Psicologia

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Rua Sarmiento Leite, 245

90050-170 Porto Alegre, RS – Brasil

Phone: 55 – 51 –8125-7492

E-mail: alcyr.oliveirajr@gmail.com

Resumo

O huperzine-A (Hup-A) possui ação inibidora da acetilcolinesterase e possível efeito neuroprotetor. Com isso, este estudo objetivou investigar os efeitos da dose aguda de Hup-A sobre o desempenho de memória e sobre o comportamento exploratório em modelo animal de dA. Os animais foram submetidos a cirurgia para lesão no núcleo basal magnocelular e os grupos controle com falsa lesão. Dividiram-se em 4 grupos: Sham+Salina, Sham+Hup-A, Lesão+Salina e Lesão+Hup-A. Após 21 dias, os grupos Sham+Salina e Lesão+Salina receberam injeção de solução salina e os animais dos grupos Sham+Hup-A e Lesão+Hup-A receberam Hup-A (0,2mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes dos testes. No teste do campo aberto, foi verificada diferença estatística na variável cruzamento entre os grupos Sham+Salina e Sham+Hup-A em relação ao grupo Lesão+Hup-A. No reconhecimento de objetos, não houve diferença estatística significativa entre grupos. Entretanto, no teste do T- elevado na variável fuga 1, houve diferença estatística expressiva entre os grupos Sham+Salina e Lesão+Hup-A. Na comparação intragrupo verificou-se diferença significativa entre latência 1 e a latência 2 no grupo Sham+Hup-A, bem como nas variáveis fuga 1 e fuga 2 no grupo Sham+Salina. Esses resultados mostraram efeitos satisfatórios na memória e comportamento exploratório para os animais tratados com dose aguda de Hup-A.

Palavras chaves: Alzheimer; Huperzine-A; Memória.

Abstract

Huperzine-A (Hup-A) has an inhibitory action of acetylcholinesterase and possible neuroprotective effect. So, this study aimed to investigate the effects of the acute dose of Hup-A on memory performance and on exploratory behavior in an animal model of dA. The animals were submitted to surgery for lesions in nucleus basalis magno cellularis and the control groups with false injury, being, then, divided into 4 groups: Sham+Salina, Sham+Hup-A, Lesão+Salina and Lesão+Hup-A. After 21 days, the groups Sham+Salina and Lesão+Salina received injections with saline solution and the animals of the group Sham+Hup-A and Lesão+Hup-A received Hup-A (0.2 mg/kg, i, p .) 30 minutes before the tests. In the open field test was verified statistical difference between groups in the crossover variable of the groups Sham+Salina and Sham+Hup-A in relation to the group Lesão+Hup-A. For the recognition of the objects, there was no statistically significant difference between groups. However, in the test of elevated-T in the variable escape1 it was found a statistically expressive difference between *Sham+Salina* and *Lesão+Hup-A*. In the intragroup comparison it was identified a significant difference between latency 1 and latency 2 in the group Sham+Hup-A, as well in the variables escape1 and escape2 in the group Sham+Salina. These results showed satisfactory effects in memory and exploratory behavior in animals that were treated with an acute dose of Hup-A.

Keywords: Alzheimer; Huperzine-A; Memory

Introdução

No mundo, cerca de 35,6 milhões de pessoas vivem com demência. Este número deverá dobrar até 2030 (65,7 milhões) e mais que triplicar em 2050 (115,4 milhões). A demência afeta pessoas com mais de meia idade (58%), especialmente em países de baixa e média renda. Em 2050, é provável que esse número avance para mais de 70% (WHO, 2012). Segundo a *World Health Organization* (2012) a doença de Alzheimer (dA) é a causa mais comum de demência.

A dA é uma doença neurodegenerativa progressiva com duração média de 8,5 anos entre o início dos sintomas clínicos e a morte do indivíduo (Fox & Alder, 2001; Francis, Pamer, Snape e Wilcock, 1999). Caracteriza-se pelo empobrecimento progressivo dos processos de memória e atenção com distintivas consequências sobre a emocionalidade (Woods, 2001; Foldi, Lobosco e Shaefer, 2002), levando a um declínio das habilidades funcionais e sociais (Fox & Alder, 2001). A deterioração das memórias de curto e longo prazo são características iniciais, seguida de afasia, apraxia, agnosia ou um distúrbio do movimento depois de vários anos de acometimento pela doença. Permanece sem perspectiva de cura até os dias atuais, e com uma alta prevalência e predominância principalmente no sexo feminino (Fox & Alder, 2001; Heun, Shoepf, Potluri e Natalwala, 2011). Uma das supostas etiologias é a “hipótese colinérgica” (Francis et al., 1999) a qual é descrita como a perda de terminações colinérgicas nos córtices frontais, parietais e hipocampo.

Na dA ocorre redução da função colinérgica central, principalmente em áreas límbicas e temporoparietais. Observa-se degeneração das projeções colinérgicas oriundas do prosencéfalo basal em direção à formação hipocampal, bem como redução da atividade da enzima colina-acetiltransferase, responsável pela síntese de acetilcolina. Tal disfunção acomete predominantemente o nível pré-sináptico, com relativa preservação da neurotransmissão pós-sináptica (partindo do hipocampo em direção às demais estruturas

temporais, límbicas e neocorticais) (Noback et al, 2005; Forlenza, 2005; Wasxman, 2010). Além da observável deterioração cognitiva, é saliente também a progressiva perda neuronal em estruturas do prosencéfalo basal com redução no número de neurônios colinérgicos localizados no núcleo basal de Meynert (Braak & Braak, 1991).

No cérebro de roedores, a estrutura correspondente é o núcleo basal magnocelular (NBM), que envia projeções colinérgicas para outras partes do cérebro, como o neo-córtex e a área septal medial com ligações para o hipocampo, bulbo olfatório e córtex visual medial (Bartus & Emerich, 1999; Braak & Braak, 1991). Excitotoxinas como o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato – (AMPA) têm sido usadas para produzir lesões e gerar modelos experimentais de depleção colinérgica localizada (Muir, Everitt e Robbins, 1994). Estes modelos devem permitir a avaliação de fenômenos biológicos naturais, induzidos ou comportamentais, que possam ser comparados aos fenômenos humanos em questão (Ferreira & Ferreira, 2003). O AMPA, usado como toxina, atua superexcitando receptores glutamatérgicos destruindo os corpos celulares em um processo de excitotoxicidade no qual ocorre uma maciça e sustentada despolarização em células pré-sinápticas (Barker & Dunnet, 1999). O AMPA causa a morte dos neurônios colinérgicos existentes no NBM sem disseminar destruição colinérgica em outras estruturas nem de outros tipos celulares (Waite, Chen, Wasdlow e Thal 1994). Como consequência, animais que tiveram o NBM lesionados por AMPA mostram dificuldades em armazenar memórias recentes, como demonstrados no labirinto em T-elevado (Oliveira, 2003) e em outros aparatos de testes que demonstrem atributos funcionais de memória e aprendizagem (Muir, Page, Sirinathsinghji, Robbins e Everitt, 1993; Waite et al., 1994).

Baseado nesta hipótese etiológica, tratamentos com inibidores da acetilcolinesterase foram desenvolvidos, sendo o primeiro a tacrina (Fox & Alder, 2001; Adams, 2008). Em pacientes com dA, os déficits colinérgicos estão associados à diminuição da função e

cognição. O tratamento com inibidores da colinesterase (ChEIs) aumenta os níveis do neurotransmissor acetilcolina (Small, 2012). Estudos clínicos demonstraram que ChEIs tem um benefício limitado, de leve a moderado, no tratamento de sintomas clínicos. Ao potencializar a acetilcolina, essas substâncias podem induzir efeitos colaterais periféricos, em especial, nos aparelhos gastroentestinal e cardiovascular, o que leva a interrupção do tratamento por alguns pacientes (Fox & Alder, 2001; Adams, 2008; Caixeta, 2012; Small, 2012).

Pepeu & Giovannini (2010) citam em um trabalho de revisão bibliográfica que, em animais experimentais, os ChEIs exercem três ações principais: inibem a colinesterase (ChE), aumentam os níveis extracelulares de acetilcolina cerebral (ACh) e melhoram os processos cognitivos, particularmente quando em modelos para dA. Citam também resultados de experimentos com animais os quais demonstraram que a estimulação do sistema colinérgico facilita a atenção, a detecção de estímulo, processamento perceptual e codificação de informação. Mulder et al. (2005) mostraram que a galantamina atenua deficiências cognitivas induzidas experimentalmente por dano neuronal leve.

Três inibidores da colinesterase foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), agência reguladora de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos, para o tratamento de demência leve a moderada: Donepezil, Galantamina e Rivastigmina (Fox & Alder, 2001; Adams, 2008). Nesta busca por novas substâncias que auxiliem no tratamento dos sintomas e contenham a evolução da dA, o uso concomitante de fármacos com supostas ações antioxidantes tais como o ginkgo biloba, a epicatequina do chá-verde e o huperzine-A (Hup-A), da *Huperzia serrata* tem chamado a atenção. Estudos recentes sugerem que o Hup-A representa uma possibilidade com grandes perspectivas para o tratamento da dA (Wang, Zhang e Tang, 2001). Sua potente ação inibidora da acetilcolinesterase, ausência de hepatotoxicidade e poucos efeitos secundários têm sido relatados (Cheng & Tang, 1998). O

Hup-A apresenta também ação antioxidante e em outros estudos indicam poderoso efeito neuroprotetor (Liang & Tang, 2004; Zhang & Tang, 2006, Shi et al., 2012).

Entretanto ainda não foram realizados estudos para verificar o efeito do Hup-A sobre a memória e comportamento exploratório. Assim sendo, o objetivo principal deste estudo foi investigar a ação de uma dose aguda do Hup-A em animais modelo para a dA, com déficit de memória

Materiais e Métodos

1.Desenho Experimental

Neste estudo, foram usados 40 ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 200 e 250 g, com idade de três meses no início do experimento. Os animais foram distribuídos em grupos com diferentes tratamentos nos seguintes moldes: Grupo Sham+Salina, Grupo Sham+Hup-A, Grupo Lesão+Salina e Grupo Lesão+Hup-A. Um animal, do grupo lesão+salina, morreu durante os testes realizando somente os testes do campo aberto e reconhecimento de objetos.

Todos os animais receberam cirurgia para lesão do núcleo basal magnocelular (NBM) com exceção dos grupos controles, que passaram por cirurgia de falsa lesão sendo injetada solução salina no lugar da excitotoxina, usada para produzir a lesão.

2. Manutenção dos Animais

Os animais foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Na chegada ao laboratório, os animais foram examinados para a detecção de possíveis problemas que poderiam interferir no desenvolvimento da pesquisa. Após o período de adaptação, foram mantidos em gaiolas plásticas com quatro animais por gaiola, em temperatura ambiente controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta e água *ad libitum*. Os ratos foram manipulados de acordo com as leis internacionais de assistência ética e uso de animais de laboratório (Guia para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais, pelo *National Institutes of Health*, 1996) e experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética local e do Comitê de Pesquisa (UFCSPA, protocolo n° 087-11).

3. Cirurgia estereotáxica

Para a cirurgia, os ratos foram previamente anestesiados com injeções intraperitoneais de xilazina + cetamina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente) (Paiva, Maffili e Santos,

2005). Após tricotomia foram colocados em aparelho estereotáxico (Insight) e tiveram os crânios expostos. Foram realizadas duas infusões unilaterais (rostral e caudal) de 0,3 µL de AMPA 0,8 mM (S-AMPA: Tocris Neuramin) em 0,05 mM de tampão salina (pH 7,4). Esta solução foi infundida manualmente através de uma seringa Hamilton (séries 700, 10 µL agulha removível, ponta plana) taxa de 0,2 µL/minuto. Foram usadas as seguintes coordenadas para atingir o NBM: a partir do bregma, anterior/posterior (AP), lateral (L) e ventral (V): crânio posicionado a 5° acima do plano inter-aural, rostral AP: +1,0; L: +2,6; V: -7,5 e caudal AP: +0,2; L: +3,2; V: -7,0. As cirurgias foram realizadas pelos pesquisadores.

Imediatamente após o término da cirurgia de lesão, os animais foram mantidos em gaiolas individuais em sala de pós-operatório com temperatura controlada e receberam comida úmida e triturada e injeções subcutâneas de solução de soro até que a alimentação voltasse ao normal.

4. Tratamento com Hup-A

Estudos anteriores, como o de Wang, Zhang e Tang (2001), demonstraram que a administração de Hup-A em 0,2 mg/kg, i.p., atenuou significativamente a atividade da acetilcolinesterase induzida pela infusão de beta-amilóide intraventricular. No presente estudo, foi usado Hup A 0,2 mg/kg, i.p., em dose única para os grupos teste e administração de volume equivalente em salina para os grupos controle. A solução estoque de Hup-A 1 mg/mL em DMSO foi preparada no laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica da UFCSPA. As doses foram preparadas de acordo com os pesos dos animais mediante diluição em salina. Estas foram administradas pelos pesquisadores.

5. Estudos Comportamentais

Após 21 dias das cirurgias foram realizados os testes comportamentais, o Hup-A foi administrado nos grupos Sham+Hup-A e Lesão+Hup-A e solução salina nos grupos

Sham+Salina e Lesão+Salina, 30 minutos antes dos animais serem submetidos ao campo aberto, reconhecimento de objetos e labirinto em T elevado, na sequência abaixo descrita.

5. 1. Campo Aberto

O aparato consiste em uma arena de madeira branca quadrada com 60 cm de diâmetro e paredes de 50 cm de altura. O piso do aparato é dividido virtualmente em 12 segmentos com aproximadamente a mesma área. Os animais foram colocados na sala de testes por 30 minutos antes do teste para habituação. Todo o percurso dos animais durante o procedimento foi gravado e analisado por dois observadores que desconheciam as condições de cada animal e os grupos a que pertenciam. Foram analisadas as variáveis de latência (tempo que o animal leva para sair do centro até a periferia), cruzamentos (número de quadrantes que o animal percorre), tempo de permanência no centro e na periferia do aparato, assim como a defecação (calculada pelo número de bolos fecais no aparato ao término do teste) (Joffe, 1965).

5.2. Reconhecimento de Objetos

O teste consiste na exposição do animal individualmente a uma arena, mesma utilizada no Campo Aberto. O teste foi dividido em duas etapas, na primeira, o animal foi gentilmente colocado no centro da arena e deixado a explorar o ambiente por dois minutos. Na segunda, dois objetos foram colocados na zona intermediária da arena (nem no centro nem próximo às paredes). Um destes objetos foi uma bola de 5 cm, que foi colocada em todos os viveiros inclusive nas gaiolas-padrão, por quatro dias de antecedência ao teste. O outro objeto foi um retângulo colorido de 5 cm ao qual os animais não tiveram nenhum contato prévio. Ambos os objetos foram fixados por uma cola no chão do aparato para evitar que se movessem. Foram medidas as variáveis tempo de exploração do objeto conhecido e exploração do objeto novo. Os animais foram colocados na sala de teste 30 minutos antes de serem submetidos a esta situação e filmados por 10 minutos e os vídeos foram analisados por dois observadores cegos para o teste.

5.3. Teste Labirinto em T- elevado

O aparato é formado por um braço fechado perpendicular a dois braços abertos elevados a 50 cm do solo. A lógica do teste é baseada no conflito de duas forças motivacionais: avaliação exploratória de novos ambientes e ativação do comportamento de defesa do ambiente perigoso ou aversivo (Treit, Menard e Royan, 1993).

No Labirinto em T-Elevado, dois tipos de respostas podem ser observadas ao mesmo tempo: respostas aprendidas ou inatas. A primeira, que diz respeito ao processo de aprendizagem de esquivas inibitórias, consiste em condicionar o animal a permanecer no braço fechado. Para isso, o animal é colocado no braço fechado livre para explorar o aparato. Então, é calculado o tempo que ele leva para sair desse espaço com as quatro patas (latência). Nesse momento ele fica livre para explorar o braço aberto e, ao retornar para o braço fechado, o animal é retirado do aparato e recolocado após um minuto. A partir de então, cada vez que o animal entrar no braço aberto ele é retirado e deixado por mais um minuto na caixa. O processo deve ser repetido até que ele permaneça cinco minutos no braço fechado (Tomaz, Dickinson-Anson, McGaugh, Sousa Silva e Viana, 1993; Viana, Tomaz e Graeff, 1994; Zangrossi & Graeff, 1997). A seguir, o animal é colocado na extremidade de um dos braços abertos e o tempo que ele leva para retornar ao braço fechado é medido (fuga). Re-expor o animal à situação após um intervalo de tempo de 72 horas, avalia a memória do comportamento relacionado ao fator emocional (Conde, Costa e Tomaz, 2000; Conde, Costa & Tomaz, 1999; Graeff, Viana e Tomaz, 1993). Considerando a descrição do instrumento, as variáveis analisadas foram tempo de latência e de fuga nos dois dias, os animais foram colocados 30 minutos antes do teste na sala do teste.

6. Perfusão

Com o animal anestesiado através de injeções intraperitoneais de xilazina + cetamina (100 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente), foi realizada uma cirurgia para a abertura do

tórax. Após, inseriu-se uma agulha no ventrículo direito do coração até a aorta, conectando a bomba de perfusão na agulha e injetando: 200 mL de salina com 0,4 mL de heparina (pré lavagem) seguido de 200 mL de paraformaldeído 4% + PBS 0,1M (lento). Após a perfusão, pré lavagem e fixação dos cérebros, estes foram removidos e fixados em paraformaldeído 4% por 24h, após mantidos em sacarose 30% na geladeira, até cinco dias antes dos cortes, quando foram congelados a -20 °C .

7. Cortes

Os cortes coronais foram feitos no criostato Leica-CM 1900, cortes em 50 µm, após coletados em séries e armazenados em “poços” com solução de sacarose a 30%, e mantidos a 4°C.

8. Imunohistologia

Para a preparação das lâminas, as fatias pré-congeladas foram lavadas 5 vezes em PBS 1x por 5 minutos cada vez. Estas foram selecionadas baseadas na estrutura alvo da lesão, depois foram colocadas nos “poços” com anticorpo primário Anti-Choline Acetyltransferase e colocadas no shaker 24h. Após foram retiradas as fatias e lavadas 5 vezes em PBS 1x por 5 minutos cada vez e novamente colocadas nos “poços” com o anticorpo secundário Alexia fluor 488 goat anti-mouse, colocadas no shaker por 1h. Após esse procedimento, foram lavadas 5 vezes em PBS 1x, em seguida foram montadas as lâminas, as quais foram avaliadas no microscópio de fluorescência Olympe BX 51 apresentando as lesões colinérgicas focais, como observadas na figura 1 (Oliveira, Hodges e Rezaie, 2003).

9. Análise Estatística

Para determinar o tamanho da amostra, neste estudo, foram estimadas variabilidade e importância do efeito tamanho. Vários estudos na área contribuíram com os valores de nível e intervalo de confiança que devem ser incluídos no cálculo amostral. Estudos sobre o mesmo assunto foram realizados usando o número de animais sugerido. Estudos da área que

apresentam resultados confiáveis têm apresentado 8-10 animais por grupo. No presente estudo, os valores de “n” para cada grupo foram obtidos com base nos dados provenientes de estudos anteriores (Hodges, et al., 2000a; Hodges, et al., 2000b; Oliveira, Grygorian e Hodges, 2000; Oliveira & Hodges, 2005; Oliveira, Majumdar, Chadwick, Pilcher e Hodges 2002)

A análise descritiva dos dados contínuos foi expressa através de médias (m) e erro padrão (EP). A análise inferencial foi utilizada para comparação entre os grupos ANOVA *One-Way*, com post-hoc de SNK (Student-Newman-keuls). Para análise intragrupos foi utilizado o teste t pareado. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 19 e observando-se uma significância estatística de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Na variável cruzamentos no campo aberto, expresso na Tabela 1 e Figura 2, observou-se diferenças significativas ($p = 0,02$) entre o grupo Lesão+Hup-A ($m = 34,50$, $EP = 10,18$) e o grupo Sham+Salina e Sham+Hup-A.

No reconhecimento de objetos (tabela 2 e figura 3), observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos. Também não houve diferença significativa entre o objeto novo e objeto conhecido em cada grupo. Porém, quando analisados os grupos Sham+Salina, Sham+Hup-A e Lesão+Hup-A os animais exploraram mais o objeto novo que os animais do grupo Lesão+Salina. No grupo Lesão+Salina, evidenciou-se a lesão não tratada porque os animais permaneceram mais tempo que os ratos dos grupos Sham+Salina, Sham+Hup-A e Lesão+Hup-A explorando o objeto já conhecido do que o objeto novo conforme ilustrado na figura 3.

No labirinto em T- Elevado (tabela 3), na análise comparativa da variável fuga 1 houve uma diferença estatística significativa ($p = 0,01$) entre os grupos Sham+Salina e

Lesão+Hup-A. Na comparação intragrupo houve diferença estatística significativa entre latência 1 e a latência 2 para o grupo Sham+Hup-A ($p=0,01$) e as nas variáveis fuga 1 e fuga 2 para o grupo Sham+Salina ($p=0,04$).

Análises imunohistológicas puderam confirmar que os animais utilizados neste estudo apresentaram a lesão no NBM, confirmando o modelo animal para a dA. Foi possível identificar, no grupo de AMPA, as células mais colinérgicas em um lado do córtex e menos dessas células no seu lado contralateral (figura 1).

Discussão

Os resultados no teste do Campo Aberto indicam que os animais do grupo Lesão+Hup-A ($m=34,50$, $EP=10,18$) fizeram mais cruzamentos que os grupos Sham+Salina e Sham+Hup-A ($p=0,02$). Esta variável avalia a capacidade motora, comportamento exploratório e a inibição comportamental. Tais resultados sugerem que o tratamento com o Hup-A foi capaz de aumentar a excitação e atenção dos animais tratados. Estes achados estão de acordo com as observações por Pepeu, Giovannini e Bracco (2013), no qual é proposto um aumento da liberação de ACh em áreas do cérebro destinadas aos processos de atenção, durante as tarefas comportamentais. Estes autores observaram que a ativação dos neurônios colinérgicos aumenta a excitação e atenção. As variáveis de quantidade de bolo fecal (defecação), tempo na periferia, tempo no centro e latência do campo aberto, conforme observadas na tabela 1, não mostraram diferença estatística significativa.

Nos resultados do reconhecimento de objetos, expressos na Tabela 2 e Figura 3, observa-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos, quanto ao reconhecimento do objeto novo e objeto conhecido. Também não houve diferença estatisticamente significativa na análise entre o objeto novo e objeto conhecido em cada grupo. Porém, nos grupos Sham+Salina, Sham+Hup-A e Lesão+Hup-A os animais exploraram mais o objeto novo quando comparados aos animais do grupo Lesão+Salina.

Estes resultados corroboram com os resultados de Mogensen et al. (2003) que sugere que na exploração espontânea de objetos é esperado que animais normais gastem mais tempo explorando objetos novos do que objetos familiares.

Os resultados obtidos com o teste de reconhecimento sugerem que o Hup-A pode ter influenciado no comportamento dos animais tratados. Conforme descritos em estudos anteriores, os quais investigaram o efeito do Hup-A na elevação da ACh, demonstrou-se uma seletividade regional para o efeito desta substância. O aumento máximo foi observado no córtex frontal e parietal após 60 minutos; intermediário no hipocampo em 30 minutos e em 5 minutos na medula oblonga após sua administração oral (Tang, De Sarmo, Sugaya e Giacobini 1989; Tang, Kendel, Kozikowski e Hanim, 1994; Wang & Tang, 1998; Wang, Fend, Lu e Tang, 1988).

Previamente, estudos revelam que o Hup-A é um potente, reversível, seletivo e bem tolerado inibidor da acetilcolinesterase (Liang & Tang, 2004; Zhang & Tang, 2006), com capacidade de transpor a barreira hematoencefálica (Wang & Tang, 1998). Sabe-se que inibidores da acetilcolinesterase aumentam a quantidade de ACh na fenda sináptica neuronal, uma vez que atuam inibindo a enzima responsável pela hidrólise da ACh consequentemente, melhorando a transmissão neuronal (Zangara, 2003). E os efeitos de Hup-A para atenuação ou reversão da perda da cognição, melhorando déficits de aprendizagem e memória tem sido demonstrada em vários modelos animais incluindo não humanos primatas (Zhang & Tang, 2006).

Já no Labirinto em T-elevado não houve diferença estatística significativa entre as variáveis latência 1 e latência 2 na comparação entre os grupos. Na comparação entre os grupos para a variável fuga 1, houve diferença significativa ($p=0,01$) entre os grupos onde o grupo Sham+Salina gastou mais tempo para fugir do braço aberto para o braço fechado ($m=128,00$, $EP=34,23$) do que o grupo Lesão+Hup-A ($m=35,11$, $EP=8,64$). Isto sugere que o

Hup-A possa ter influenciado no comportamento dos animais, pois os mesmos podem ficar mais ativos após a administração de Hup-A. Gao et al. (2009) demonstraram em seu estudo que o Hup-A pode proteger a mitocôndria contra a proteína β -amilóide, pelo menos em parte, através da preservação da integridade da membrana e melhorando o metabolismo energético. Estes efeitos diretos sobre mitocôndrias podem ampliar ainda mais as funções colinérgicas.

Na comparação intragrupo, entre as variáveis latência 1 e latência 2, o grupo Sham+Hup-A permaneceu mais tempo no braço fechado no segundo dia (latência 2) em relação ao primeiro dia (latência 1) do teste ($p=0,01$). Era esperado também que o grupo Sham+salina e o grupo tratado (Lesão+Hup-A) tivessem o tempo de latência aumentado do primeiro dia para o segundo dia e o tempo de fuga diminuído. Este fato é devido à aquisição de esquiva proporcionada pela fase de treinamento por critérios, realizada no primeiro dia do teste. Assim, considerando o treinamento por critérios, o número de tentativas até atingir o critério de 5 minutos no braço fechado, espera-se que o grupo salina aprenda mais rápido do que o lesão (Tomaz et al., 1993; Viana, Tomaz e Graeff, 1994; Zangrossi & Graeff, 1997). Os grupos Sham+Salina e Lesão+Hup-A tiveram um aumento no tempo de latência 1 e latência 2, porém não estatisticamente significativos. O grupo Lesão+Salina demonstrou um leve aumento também nestas variáveis. Já na comparação entre as variáveis fuga 1 e fuga 2, o grupo Sham+Salina retornou da extremidade do braço aberto para o braço fechado em menos tempo no segundo dia (fuga 2) indicando retenção de memória para o estímulo aversivo (espaço aberto) em comparação com o primeiro dia do teste ($p=0,04$).

O estudo, entretanto, apresenta algumas limitações. A primeira delas é o fato de que os sintomas produzidos pela lesão ser específico para o modelo animal, ou seja, os animais apresentam declínio de memória espacial o que raramente é observado em sujeitos humanos. Outra questão em relação ao modelo refere-se a ser este um modelo de lesão. Existe homologia entre as estruturas colinérgicamente deficitárias em homens e roedores. Entretanto,

todos os outros sintomas da patologia humana, no modelo ficam restritos à diminuição de terminações colinérgicas nas área de projeção (córtices parietal e frontal).

A partir dos resultados encontrados neste trabalho, evidencia-se que o Hup-A influencia no comportamento e memória dos animais tratados, havendo a necessidade de mais estudos no que se refere ao tratamento agudo com o Hup-A, pois a maioria das pesquisas demonstraram que os efeitos do Hup-A foram avaliados a partir de tratamentos crônicos Wang, Zhang e Tang, (2001), Wang et al. (2008) e Shi et al. (2012).

Alguns estudos relatam que o uso associado do Hup-A com alguns fármacos pode ser utilizado no tratamento da dA. Shi et al. (2010) verificaram que a administração concomitante de Hup-A e Ligustrazine (extraído da erva ligustrazine e atua com agonista beta-adrenergico e anti-inflamatório), demonstrou uma efetiva melhora nos déficits de memória e amenizou os déficits colinérgicos e o estresse oxidativo em ratos com amnésia. Zhang et al (2008), em uma revisão, citam estudos os quais indicam substâncias extraídas de ervas, como Hup-A, tem efeitos comprovados de melhora na função colinérgica, efeitos neuroprotetores, estresse oxidativo, apoptose mitocondrial e efeito anti-inflamatório. Tais efeitos poderiam contribuir não só para a melhora dos sintomas, mas também retardar a progressão da dA e demência vascular.

Portanto, tendo em vista os achados neste estudo bem como dados já relatados na literatura científica, estima-se que o Hup-A poderá consolidar-se como uma alternativa relevante para o tratamento da dA. No entanto, novos e mais aprofundados estudos devem ser conduzidos no intuito de elucidar seus possíveis alvos moleculares e mecanismo de ação.

Referências Bibliográficas

- Adams, A.C. (2008). Mayo Clinic Essential Neurology. Mayo Foundation for Medical Education and Research. USA, 8, 199-204.
- Alzheimer's Association (2011). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 7, 208-244.
- Barker, R. A., & Dunnett, S. B. (1999). Neural repair, transplantation and rehabilitation. Hove: Psychology Press Ltd.
- Bartus, R. T., & Emerich, D. F. (1999). Cholinergic markers in Alzheimer disease. *Journal of American Medical Association*, 15(282), 2208-22.
- Bear, M.F., Connors, B.W., Pardiso, M.A. (2008). Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso, 3º ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2, 36.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239-259.
- Caixeta, L. Tratamento da Doença de Alzheimer – da magia à evidência in Caixeta, L. e colaboradores. Doença de Alzheimer (2012). 1ºed, Ed. Artmed, Porto Alegre, 24, 369-391.
- Casamenti, F., Prosperi, C., Scali, C., Giovannelli, L., & Pepeu, G. (1998). Morphological, biochemical and behavioural changes induced by neurotoxic and inflammatory insults to the nucleus basalis. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16 (7-8), 705-714.
- Cheng, D. H., & Tang, X. C. (1998). Comparative Studies of Huperzine-A, E 2020 and Tacrine on Behavior and cholinesterase Activities. *Pharmacology Biochemistry and Behavioral*, Vol. 60, 2, 377–386.
- Conde, C., Costa, V., & Tomaz. C. (2000). Effects of emotional reactivity on inhibitory avoidance in the elevated T-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(2), 233-236.

- Conde, C. A., Costa, V., & Tomaz, C. (1999). Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 63(1), 63-69.
- Ferreira, L.M., Ferreira, L.R.K. (2003). Experimental model: Historic and conceptual revision. *Acta Cirurgica Brasileira*, 18, 1-3.
- Foldi, N. S., Lobosco, J. J., & Schaefer, L. A. (2002). The effect of attentional dysfunction in Alzheimer's disease: theoretical and practical implications. *Seminars in Speech and Language*, 23(2), 139-150.
- Forlenza, V.O. (2005). Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Revista de Psiquiatria Clínica*, São Paulo, vol.32, 3.
- Fox, C.M., Alder, R.N., Mecanismos Neurais do Envelhecimento in Cohen, H. *Neurociências para Fisioterapeutas* (2012). 2º ed., Ed. Manole, Barueri, SP, 17, 344.
- Francis, P.T, Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal Neurologic Neurosurgery Psychiatry*; 66:137–47.
- Gao, X., Zheng, C. Y., Yang, L., Tang, X. C., Zhang, H. Y. (2009). Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against β - amyloid peptide. *Free Radical Biology & Medicine*, 46, 1454-1462.
- Graeff, F. G., Viana, M. B., & Tomaz, C. (1993). The elevated T-maze: a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26, 67-70.
- Heun, R., Shoepf, D., Potluri, R., Natalwala, A. (2011). Alzheimer's disease and comorbidity: Increased prevalence and possible risk factors of excess mortality in naturalistic 7-year follow-up. *European Psychiatry*, 1-9.
- Hodges, H., Sowinski, P., Virley, D., Nelson, A., Kershaw, T. R., Watson, W. P., Veizovic, T., Patel, S., Mora, A., Rashid, T., French, S. J., Chadwich, A., Gray, J. A., Sinden, J. D. (2000). Functional reconstruction of the hippocampus: fetal versus conditionally immortal neuroepithelial stem cell grafts. *Novartis Foundation Symposium*, 231, 53-65.

- Hodges, H., Veizovic, T., Bray, N., French, S. J., Rashid, T. P., Chadwick, A., Patel, S., Gray, J. A. (2000). Conditionally immortal neuroepithelial stem cell grafts reverse age-associated memory impairments in rats. *Neuroscience*, 101(4), 945-955.
- Joffe, J. M. (1965). The effect of prenatal maternal stress on emotionality and learning ability in rats selected for emotional reactivity. Unpublished PhD, University of London.
- Liang, Y.Q., & Tang, X.C. (2004). Comparative effects of de Hup-A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholinesterase activity in rats. *Neuroscience Letters*, 361, 56-59.
- Mogensen, J., Lauritsen, K. T., Elvertorp, S., Hasman, A., Moustgaard, A., Wörtwein, G., (2004). Place learning and object recognition by rats subjected to transaction of the fimbria-fornix and/or ablation of the prefrontal cortex. *Brain Research Bulletin*, 63, 217-236.
- Mogensen, J., Svendsen, G., Lauritsen, K. T., Ermens, P., Hasman, A., Elvertorp, S., Plenge, P., Mellerup, E., Wötwein, G. (2003). Associative and nonassociative learning after chronic impramine in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavioral*, 76, 197-213.
- Muir, J. L., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1994). AMPA-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain: a significant role for the cortical cholinergic system in attentional function. *Journal of Neuroscience*, 14(4), 2313-2326.
- Muir, J. L., Page, K. J., Sirinathsinghji, D. J., Robbins, T. W. & Everitt, B. J. (1993). Excitotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons: effects on learning, memory and attention. *Behavioural Brain Research*, 57(2), 123-131.
- Mulder, J., Harkany, T., Czollner, K., Cremers, T. I. F. H., Keijser, J. N., Nyakas, Luiten, P. G. M. (2005). Galantamine-induced behavioral recovery after sublethal excitotoxic lesions to the rat medial septum. *Behavioural Brain Research* 163, 33-41.
- Noback, C. R., Stroming, N. L., Demarest, R. J., Ruggiero, D. A. (2005). *The Human Nervous system: Structure and Function*. 6th ed., Humana Press.

Oliveira, A., & Hodges, H. (2005). Alzheimer's Disease and Neural Transplantation as Prospective Cell Therapy. *Current Alzheimer Research*, 2(1), 79-95.

Oliveira, A. A. (2003). Stem cell graft effects following unilateral cholinergic depletion. 322 paginas, tese doutorado, University of London, Institute of psychiatry, King's College, de Crespigny, London.

Oliveira, A., Hodges, H., Rezaie, P. (2003). Excitotoxic lesioning of the rat basal forebrain with S- AMPA, consequent mineralization and associated glial response. *Experimental Neurology*, 179, 127-138.

Oliveira, A., Majumdar, S., Ilia, M., Chadwick, A., Pilcher, H., Hodges, H., et al. (2002). Human neural stem cell line graft effects in rats after AMPA-induced lesions of the basal forebrain. *Annals of the 3rd Federation of European Neuroscience Societies Meeting*.

Oliveira, A., Grygorian, G., & Hodges, H. (2000). Behavioural effects of MHP36 and MHP15 cell line grafts following AMPA-induced lesions of the nucleus basalis magnocellularis in rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 3(Supplement 1), S360.

Pepeu, G., Giovannini, M. G., Bracco, L. (2013). Effect of cholinesterase inhibitors on attention. *Chemico-Biological Interactions*, vol.203, 1, 361-364.

Pepeu, G., Giovannini, M. G., (2010). Cholinesterase inhibitors and memory. *Chemico-Biological Interactions*, 187, 403-408.

Shi, Q., Fu, J., Di, G., Yan, H., Ran, J., Liu, Z., Wei, J., Diao, T., Lu, Y. (2012). Huperzine A Ameliorates Cognitive Deficits and Oxidative Stress in the Hippocampus of Rats Exposed to Acute Hypobaric Hypoxia. *Neurochemical Research*, 37, 9, 2042-2052.

Shi, J., Lui, Q., Wang, Y. Luo G. (2010). Coadministration of huperzine A and ligustrazine phosphate effectively reverses scopolamine induced amnesia in rats. *Biochemistry and Behavior*, 96, 449-453.

- Small, G. (2012). Pharmacological Rationale for cholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 33, s1-s38.
- Tang, X. C., De Sarmo, P., Sugaya, K., Giacobini, E. (1989). Effect of huperzine A, a new cholinesterase inhibitor on the central cholinergic system of the rat. *Journal Neuroscience. Res*, 24, 276-285.
- Tang, X. C., Kendel, G. H., Kozikowski, A. P., Hanin, I. (1994). Comparasion of the effects of natural and synthetic huperzine A on rat brain cholinergic function in vitro and in vivo. *Journal Ethnopharmacology*, 44, 147-155.
- Tomaz, C., Dickinson-Anson, H., McGaugh, J. L., Souza-Silva, M. A., Viana, M. B., & Graeff, F. G. (1993). Localization in the amygdale of the amnestic action of diazepam on emotional memory. *Behavioural Brain Research*, 58, 99-105.
- Treit, D., Menard, J., & Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavioral*, 44(2), 463-469.
- Viana, M. B., Tomaz, C., & Graeff, F. G. (1994). The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavioral*, 49(3), 549-554.
- Waite, J. J., Chen, A. D., Wardlow, M. L., & Thal, L. J. (1994). Behavioral and biochemical consequences of combined lesions of the medial septum/diagonal band and nucleus basalis in the rat when ibotenic acid, quisqualic acid, and AMPA are used. *Experimental Neurology*, 130(2), 214-229.
- Wang, H., Tang, X. C. (1998). Anticholinesterase effects of Hup-A, E2020, and tacrine in rats. *Acta Pharmacology*, 19, 27-30.
- Wang, Y. E., Fend, J., Lu, W. H., Tang, X. C. (1988). Pharmacokinetics of huperzine A in rats and mice. *Zongguo Yao Li Xue Bao*, 9, 193-196.

- Wang, R., Zhang, H. Y., & Tang, X. C. (2001). Hup-A attenuates cognitive dysfunction and degeneration caused by β – amyloid protein-(1-40) in rats. *European Journal of Pharmacology*, 421, 149-156.
- Wang, Z. F., Tang, L. L., Yan, H., Wang, Y. Y, Tang, X. C. (2006). Effectos of Hup-A on memory deficits and neurotrophic factors production after transcent cerebral ischemia and reperfusion in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 83, 603-611.
- Wasxman, S. G. (2010). *Clinical Neuroanatomy*, A Lance Medical Book, New York, USA, ed. 26, 3, 29.
- Woods, R. T. (2001). Discovering the person with Alzheimer's disease: cognitive, emotional and behavioural aspects. *Aging & Mental Health*, 5(1), 7-16.
- Word Health Organization (2012). Disponível em: www.who.int/en. Acessado em: 10/10/2012.
- Zangara A. (2003). The psychopharmacology of Hup-A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry Behavioral*, 75(3):675-86.
- Zhang, H. Y., & Tang, X. C. (2006). Neuroprotective effects of Hup-A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Pharmacological Sciences*, 27(12), 619-625.
- Zhang, H. Y., Zheng, C. Y. Yan, H., Wang, Z. F., Tang, L. L., Gao, x., Tang, X. C. (2008). Potential therapeutic targets of Huperzine A for Alzheimer's disease and vascular dementia. *Chemico Biological Interactions*, 175- issue 1-3, 396-402.
- Zangrossi, H., Jr, & Graeff, F. G. (1997). Behavioral validation of the elevated T-maze a new animal model of anxiety. *Brain Research Bulletin*, 44(1),1.

TABELAS

Tabela 1: Campo aberto

Variáveis	G1 n=10		G2 n=8		G3 n=12		G4 n=9		Valor de p*
	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	
Cruzamentos	24,70 ^a	7,80	23,13 ^b	6,33	27,50	5,64	34,50 ^{a,b}	10,18	0,02
Quantidade de bolo fecal	1,90	0,48	2,88	0,51	2,08	0,37	2,89	0,58	0,35
Tempo na periferia (seg)	112,70	1,18	114,50	0,77	114,42	0,87	112,56	1,20	0,39
Tempo no centro (seg)	7,40	1,15	5,50	0,77	5,58	0,87	7,44	1,20	0,35
Latência (seg)	5,80	0,86	5,50	0,77	5,33	0,79	5,89	1,11	0,96
Legenda: valores expressos em média e erro padrão									

G1 = Grupo Sham+Salina, G2 = Grupo Sham+Hup-A, G3 = Grupo Lesão+Salina, G4 = Grupo Lesão+Hup-A

*valor de p = utilizado Anova one-way, Post-Hoc de SNK, letras iguais diferem entre si.

Tabela 2: Reconhecimento de objeto

Variáveis	G1 n=10			G2 n=8			G3 n=12			G4 n=9			Valor de p*
	Média	Erro Padrão	$^{\dagger}p$	Média	Erro Padrão	$^{\dagger}p$	Média	Erro Padrão	$^{\dagger}p$	Média	Erro Padrão	$^{\dagger}p$	
Tempo com objeto novo (seg)	17,40	4,49	0,10	14,25	7,15	0,497	9,25	2,21	0,843	8,78	2,60	0,071	0,39
Tempo com objeto conhecido (seg)	11,00	2,49		10,13	2,58		9,75	2,77		3,89	0,98		0,18
Tempo de exploração do ambiente (seg)	27,30	8,77		24,38	9,07		19,00	4,36		12,67	3,14		0,35

Legenda: valores expressos em média e erro padrão

G1 = Grupo Sham+Salina, G2 = Grupo Sham+Hup-A, G3 = Grupo Lesão+Salina, G4 = Grupo Lesão+Hup-A

*valor de p = utilizado Anova one-way.

$^{\dagger}p$ = Teste t pareado para tempo com objeto novo e tempo com objeto conhecido em segundos.

Tabela 3: Labirinto em T elevado

Variáveis	G1 n=10			G2 n=8			G3 n=12			G4 n=9		
	Média	Erro Padrão	[†] p	Média	Erro Padrão	[†] p	Média	Erro Padrão	[†] p	Média	Erro Padrão	[†] p
Latência 1 (seg)	161,3 0	45,76	[‡] 0,20	103,3 8	43,12	[‡] 0,01	216,2 7	37,53	[‡] 0,41	179,4 4	47,84	[‡] 0,12
Latência 2 (seg)	240,0 0	36,88		265,6 3	34,37		249,5 5	33,86		244,8 9	36,52	
Fuga 1 (seg)	128,00 ^a	34,23	[#] 0,04	46,88	10,46	[#] 0,57	68,73	9,13	[#] 0,09 1	35,11 ^a	8,64	[#] 0,29
Fuga 2 (seg)	49,00	11,96		39,63	12,30		43,82	11,77		72,89	29,51	

Legenda: valores expressos em média e erro padrão

G1 = Grupo Sham+Salina, G2 = Grupo Sham+Hup-A, G3 = Grupo Lesão+Salina, G4 = Grupo Lesão+Hup-A.

[†]p = Teste t pareado para ([‡]) Latência 1 e Latência 2 e ([#]) Fuga 1 e Fuga 2

Valor de p* = Anova one-way, com Post-Hoc de SNK, letras iguais diferem entre si

Figuras

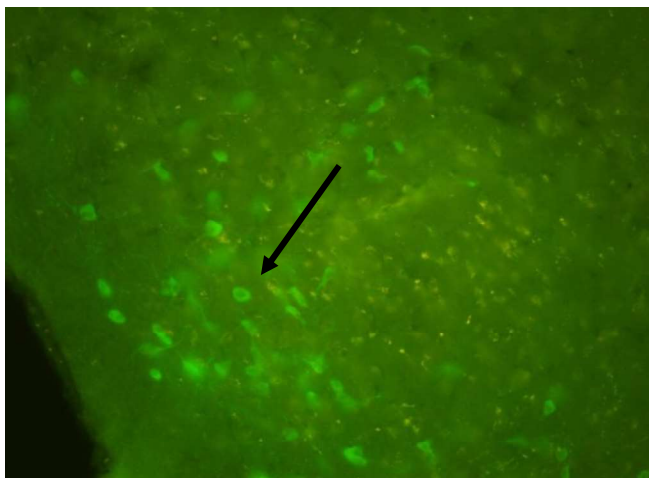


Figura 1: Análise imunohistológica confirmando a obtenção de um modelo animal para a dA, na qual observa-se um acúmulo de neurônios colinérgicos concentrados em um lado do córtex, a seta indica neurônio colinérgico positivamente marcado pelo anticorpo Anti-AChE.

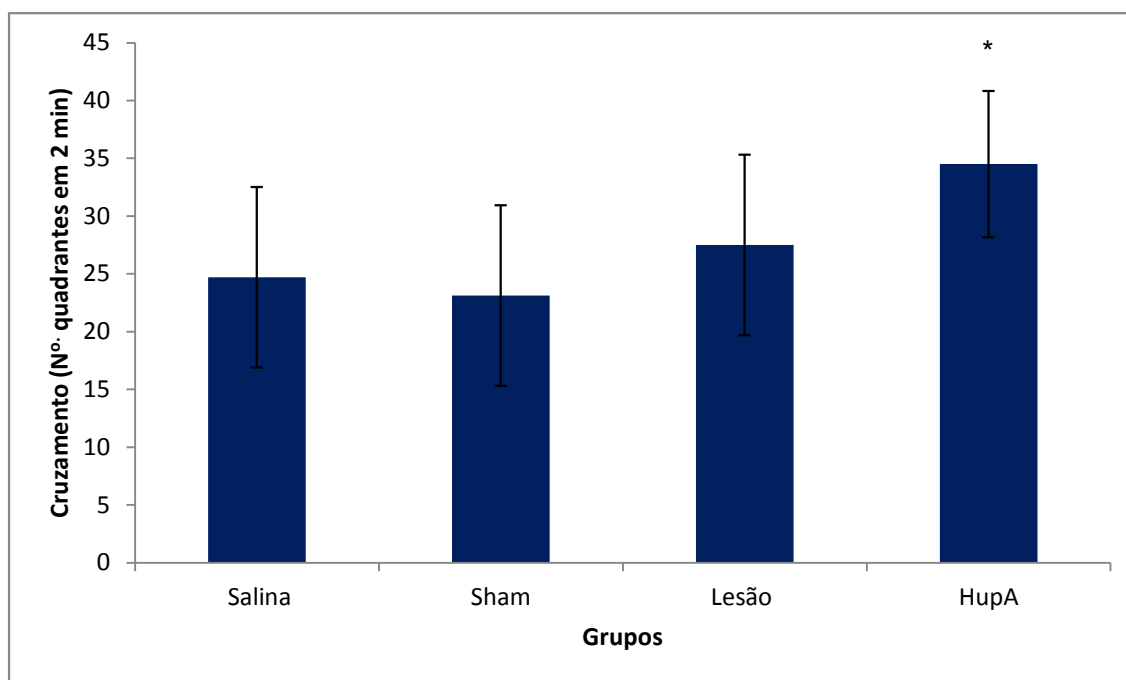


Figura 2: Número de cruzamentos em 2min após a administração das substâncias nos diferentes grupos: Sham+Salina (Salina) (n=10), Sham+Hup-A (Sham) (n=8), Lesão+Salina (Lesão) (n=12) e Lesão+Hup-A (Hup-A) (n=9). Sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$ (*).

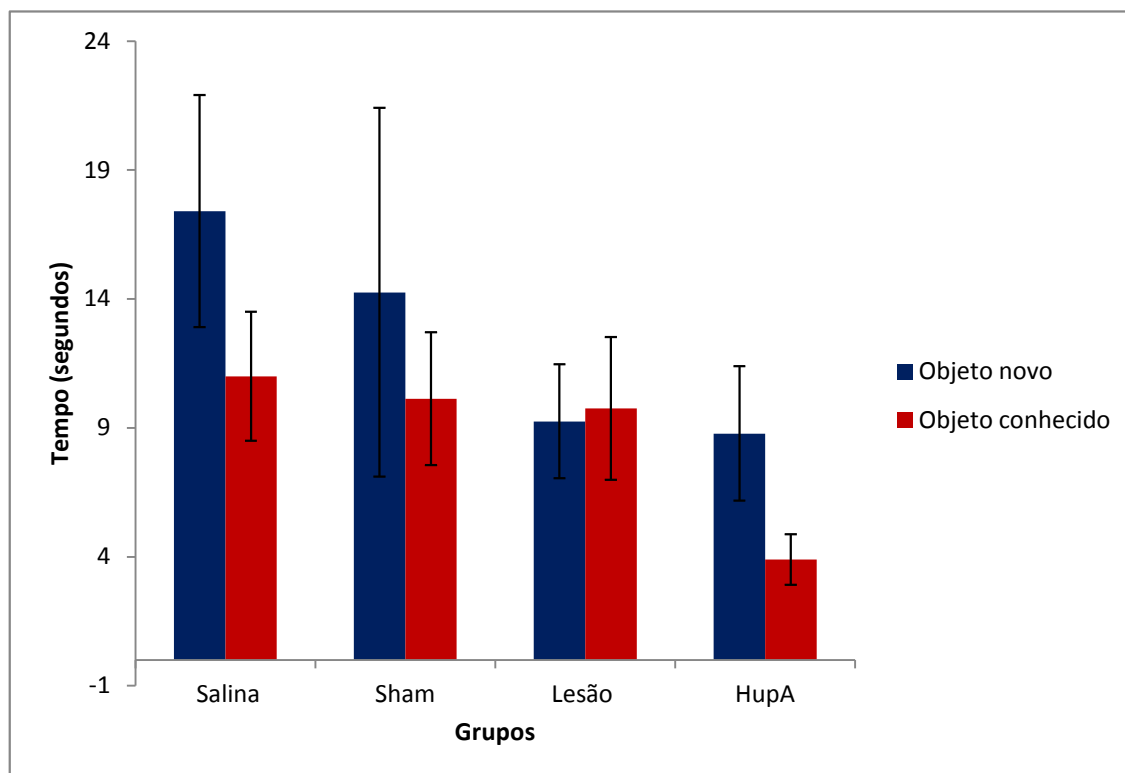


Figura 3: Reconhecimento de objeto novo (azul) e objeto conhecido (vermelho) nos diferentes grupos testados: Sham+Salina (Salina) (n=10), Sham+Hup-A (Sham) (n=8), Lesão+Salina (Lesão) (n=12) e Lesão+Hup-A (Hup-A) (n=9). Sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

6.CONCLUSÃO GERAL

Vários estudos relatam os efeitos benéficos de substâncias extraídas de plantas na prevenção ou tratamento de diversas doenças. Dentre estas substâncias, encontra-se o Hup-A, oriundo da erva Huperzia Serrata, o qual tem efeitos comprovados cientificamente no que se refere à melhora na função colinérgica, efeitos neuroprotetores a partir da regulação do metabolismo da proteína precursora de amiloide, prevenção ao estresse oxidativo, apoptose mitocondrial e efeito antiinflamatório. Tais efeitos atribuídos ao Hup-A são bastante citados uma vez que podem contribuir na melhora dos sintomas e também retardar a progressão da dA.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com dados da literatura científica no que se refere a uma melhora no comportamento e memória, em um modelo experimental da dA tratado com Hup-A. No entanto, vale ressaltar que no presente estudo foi utilizada uma dose aguda de Hup-A e a maioria das pesquisas demonstram os efeitos dessa substância a partir de um tratamento crônico. Sendo, portanto, necessário um aprofundamento das pesquisas a respeito dos possíveis efeitos benéficos do tratamento agudo como o Hup-A

Nesta perspectiva, sugere-se que o Hup-A, futuramente, possa apresentar-se como uma droga promissora para investigações em estudos clínicos de pacientes com dA e também, possivelmente, sua associação com outros fármacos utilizados na clínica para tratamento dA.

ANEXO 1



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 052/11

Parecer 087/11

2) DATA DO PARECER: 05/10/2011

3) TÍTULO DO PROJETO:

Efeitos da Huperzine A sobre o comportamento exploratório de ratos em modelo de Doença de Alzheimer

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Alcyr de Oliveira

5) RESUMO DO PROJETO:

Trata-se de um projeto experimental, o qual utiliza 36 ratos machos Wistar. O objetivo principal é verificar o efeito da Huperzine A (substância antioxidante) sobre a memória, atividade motora e comportamento exploratório de animais submetidos a modelo de indução de doença de Alzheimer. A indução da doença de Alzheimer é realizada através de dano químico induzido pela administração de AMPA no núcleo basal magnocelular, através de cirurgia estereotáxica. Após 14 dias da cirurgia estereotáxica os animais serão divididos em 3 grupos: G1: salina + salina; G2: lesão + huperzine A e G3: lesão + salina; receberão uma única administração de salina ou huperzepine (0,2mg/kg). Após passarão pelos testes comportamentais: campo aberto (atividade motora, exploração, habituação), reconhecimento de objetos (memória de reconhecimento) e labirinto em T elevado (desempenho da memória). Após ter completado os testes comportamentais, serão eutanasiados e o cérebro analisados no que se refere à lesão colinérgica.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Investigar os efeitos da Huperzine A sobre a memória, atividade motora e o comportamento exploratório em um modelo animal de doença de Alzheimer.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

☐

Ensino

☒

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

☒

Adequado

☐

Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Introdução ☒ Adequada ☐ Comentários

Objetivos ☒ Adequados ☐ Comentários

Relevância e Justificativa ☒ Adequados ☐ Comentários

Materiais e Métodos ☒ Adequados ☐ Comentários

Cronograma para execução da pesquisa ☒ Adequado ☐ Comentários

Orçamento e fonte financiadora ☒ Adequados ☐ Comentários

Referências Bibliográficas ☒ Adequadas ☐ Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒ Sim ☐ Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B ☐ C ☐ D ☒ E ☐

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: ☐ Sim ☒ Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: ☐ Sim ☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:



UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Aprimoramento da Metodologia: ☐ Sim ☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Veja comentário ao final do documento.

Acomodação e manutenção dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório): Laboratório de Fisiologia da UFCSPA

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
	Ratos Wistar	machos	36

12) RECOMENDAÇÃO:

☒ Aprovado

☐ Com Pendência



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

☐ Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

Os autores responderam adequadamente a todos os questionamentos feitos, melhorando a qualidade do projeto. O projeto está adequado (aprovado).

ANEXO 2

Normas de formatação do periódico “Psicologia: Reflexão e Crítica/Psychology.”

Aim and editorial policy

Its objective is to publish original manuscripts in the areas of developmental psychology, psychological assessment and experimental psychology in the following categories: research reports, theoretical or systematic review articles, short communications and book reviews.

DEFINITION OF BASIC PSYCHOLOGICAL PROCESSES OR BASIC PROCESSES IN PSYCHOLOGY

Objective: To study processes such as sensation, attention, perception, learning and memory, motivation and emotion, as well as language. Concerning this thematic, complex cognitive functions such as language, reasoning, problem solving, decision making and executive functions are also included.

Method: It is usually used the experimental method (and quasi-experimental).

Interfaces: neuroscience, neuropsychology, cognitive psychology, biological psychology, psychopharmacology, experimental analysis of behavior.

DEFINITION OF PSYCHOLOGICAL ASSESSMENT

Objective: To study topics related to psychometrics, adaptation, development, validation or standardization of instruments, use of instruments for psychological assessment, psychodiagnosis, assessment of interventions or programs, and case studies involving the use of instruments. Ethical issues or techniques involving Psychological Assessment may also be submitted.

DEFINITION OF DEVELOPMENTAL PSYCHOLOGY

Objective: To study processes of ontogenetic change and/or variables related to such processes throughout the life cycle, taken into any theoretical approach. The fact that the study was conducted with children, adolescents, adults or seniors does not imply, in itself, the work is in the area of

development.

The editorial policy of the journal **Psicologia: Reflexão e Crítica/Psychology** consists of peer evaluation, following the criteria described below.

Steps for on-line submission

From June 1st, 2012 it will be charged a publication fee of R\$ 350,00 (see "Publication Fee" below).

There are two steps for online submission of manuscripts: to send an e-mail (1) forwarding a letter regarding the manuscript and (2) the formal aspects of presenting it, as described below. The author(s) will immediately receive an acknowledgment of receipt when the manuscript is received and they may follow-up the online editorial process using the author's username and login.

Step 1: The main author must send an e-mail to the editor (prcrev@ufrgs.br) authorizing the beginning of the editorial process of the manuscript. EVERY author must state their agreement with the submission and **Publication Fee** to the editor. All required ethical procedures have been met. **In the e-mail to be sent to the editor do not enclose any copy of the manuscript.** The manuscript must be submitted electronically only (according to Step 2). The e-mail replaces the identifying cover page and must inform as well:

- title of the manuscript in Portuguese and in English (maximum of 15 words);
- name and institutional affiliation of each author;
- name of the authors as they should appear in reference citations;
- postal address of the author with whom the reader may engage in correspondence (we recommend using institutional addresses);
- acknowledgments and observations.

Step 2: Formal aspects of presenting the manuscript. Original papers must be submitted online by means of the main author's registration in the journal's site on the Internet

(<http://www.seer.ufrgs.br/index.php/PsicReflexaoCritica>).

Since peer review of the manuscript is blinded, it is the responsibility of the author(s) to verify that there are no

elements in the manuscript that can identify authorship, including the properties of the electronic file. The e-mail containing data of the author(s) will not be forwarded to the Ad-Hoc reviewers.

Manuscripts

One of the conditions for publishing the manuscript is that it must not have been edited in any other publication (journals, books, etc.) nor simultaneously submitted to, or edited in, any other publication (electronic media or printed).

All the manuscripts must follow the technical standards of the American Psychological Association: Publication Manual of the American Psychological Association (5th edition, 2001), concerning the style of manuscript presentation and ethical aspects regarding the accomplishment of a scientific work. When pertinent, a copy of approval of research from the Ethical Committee in Scientific Research should be forwarded when submitting the manuscript. Without this copy, it will not be started the editorial process of the manuscript. Except in specific situations where there is conflict with the need to assure fulfillment of the blinded review by peers, Portuguese language rules, or internal procedures of the journal, including the characteristics of online submission. From the following details below, APA standards prevail in case information is omitted. Manuscripts must be written in Portuguese.

For a quick guide in Portuguese, consult [Uma Adaptação do Estilo de Normalizar de Acordo com as Normas da APA](#). For examples of sections of the manuscript in English, we suggest consulting [Psychology With Style: A Hypertext Writing Guide \(for the 5th edition of the APA Manual\)](#).

Original text should be submitted by Internet through the enrollment of the author(s) in the site of the journal (<http://www.seer.ufrgs.br/index.php/PsicReflexaoCritica>). Since the review of the manuscripts is blinded regarding the identity of the author(s), it is their responsibility to verify that there are no elements which may identify them in any part of the manuscript, including in the properties of the file. The e-mail with the author(s)' data will not be forwarded to

Ad- Hoc reviewers.

I. Manuscripts

The manuscript must be produced in Microsoft Word (.doc) and not exceed the maximum number of pages (starting page 1 with the *Resumo*-abstract in Portuguese) indicated for each type of manuscript (including *Resumo*, Abstract, Figures, Tables, Appendixes and References, besides the body of the text), which would be:

Articles(15-25 pages): reports of original high quality researches, based on complete and systematic investigations. Articles of theoretical or reviewing content will be considered, but in a restricted number, as long as there is critical and propitious analysis from a wide body of investigation, that is relative to subjects of interest for the development of Psychology, preferably in an area of research that the author contributes to.

Short reports(10-15 pages): short descriptions of research or professional experience with methodologically appropriate evidence. Manuscripts that describe new methods or techniques will also be considered.

Review articles(3-10 pages): critical reviews of recently published works, orientating the reader as so much of the potentials and characteristics of its use. Authors should consult the Editor before submitting reviews to the editorial process. They must have title and the reviewed book must appear in the References at the end of the text.

II. General Guidelines

A. Paper: size A4 (21 x 29,7cm). The manuscript may not be longer than 25 pages, from the *Resumo* to the References, including Tables, Figures and Appendixes.

B. Font: Times New Roman, size 12, throughout the whole

text, including References, Foot Notes, Tables, etc.

C. Margins: 2,5cm on all sides (upper, bottom, left and right).

D. Spacing: double space throughout all of the manuscript, including Unidentified Title Page, *Resumo*, Abstract, Text, References, Appendixes, etc.

E. Text alignment: left.

F. Indent for the first line of a paragraph: tab = 1,25cm.

G. Page number alignment: on the right corner at the level of the first line of each page.

H. Manuscript Page Heading: the first two or three words of the title should appear five spaces to the left from the number. The page heading is used to identify the manuscript during the editorial process. Using MS Word, when the page's number and the heading are inserted in a page, they automatically appear in all the others.

I. Internet addresses: all "URL" addresses (links to the Internet) in the text (ex: <http://pkp.sfu.ca>) should be activated.

J. Order of the manuscript's elements: Unidentified Title Page, *Resumo* and Abstract, Text, References, Appendixes, Footnotes, Tables and Figures. Initiate each one on a new page.

III. Manuscript elements:

A. Unidentified Title Page: Title in Portuguese (maximum 15 words, uppercase and lowercase letters, centralized) and the title in English compatible with the title in Portuguese.

B. *Resumo* and Abstract with keywords: Paragraphs with the maximum of 200 words (articles), or 150 words (short reports), with the title *Resumo*/Abstract aligned in the center on the first line below the page heading. At the end of the *Resumo*, list at least three and at the most five keywords in Portuguese (in uppercase letters and separated by semicolons), preferably derived from the [Terminologia em Psicologia, da Biblioteca Virtual em Saúde - Psicologia](#). The Abstract in English should be faithful to the *Resumo* in Portuguese, but not a literal translation. It means, the translation should preserve the

content of the *Resumo* but it has also to be adapted to English language grammatical style. The Abstract must be followed by keywords as well. As its main procedure, **Psicologia: Reflexao e Critica/Psychology** makes the final review of the abstract, having the right to correct it, whenever necessary. This is a very important item in your work, because when a paper is published it will be available in all of the journal's indexing sources.

C. Text: The title of the manuscript is not necessary on this page. The subsections of the text do not start on new pages and its headings should be aligned in the center, and the first letter of each word capitalized (for example, Results, Method and Discussion, in research papers). The subheadings of the subsections should be in italic and have the first letter of each word capitalized (for example, the heading of the subsection Method: *Subjects* or *Data Analysis*).

The words **Figure, Table, Appendix** that appear in the text should be written with the first letter capitalized followed by the number (Figures and Tables) or letter (Appendixes) to which they refer. The places suggested for inserting figures and tables should be indicated in the text.

Use underline, *Italic* and **bold** in words or expressions that should be emphasized in the text, for example foreign words to Portuguese, such as *self*, *locus*, etc. and words that you wish to lay stress upon. Do not use Italic (unless where it is required by publication rules), bold, watermarks or other resources which may let the text visually more attractive, because they bring hard trouble for editing.

Always cite authors and give the date of publication of all referred studies. Names of all the authors whose works were cited should be followed by the date of publication. All studies cited in the text should be listed in the Reference section.

Examples of Reference:

The following examples aid you in the organization of your manuscript, but they certainly do not deplete other possibilities of citing. Use the Publication Manual of the American Psychological Association (2001, 5th edition) to verify the pattern for other references.

1. Articles with multiple authors:

Articles with two authors: always cite both names when

referring to the article:

Carvalho and Beraldo (2006) had accomplished qualitative analysis...

This qualitative analysis (Carvalho & Beraldo, 2006)...

Articles with three to five authors: cite all authors on the first citation and for the subsequent citations mention the first author followed by "et al." and the date of publication:

Mansur, Carrthery, Caramelli and Nitrini (2006) reviewed literature from this area.

This was described in another article (Mansur, et al., 2006).

Articles with six or more authors: cite only the last name of the first author, followed by "et al." and the date.

However, in the References section, the names of all the authors should be mentioned.

2. Citations of republished or re-edited work:

In fact, Skinner (1963/1975) ... when explaining the behavior (Skinner, 1963/1975).

In the References section, cite: Skinner, B. F. (1975). *Contingências de reforço*. São Paulo: Abril Cultural. (Original work published in 1963)

REMINDER: Quotations with less than 40 words should be incorporated in the paragraph of the text, between quotation marks. Quotations with more than 40 words should appear without quotation marks in a freestanding block, indent the block about 5 spaces from the margin. Quotations with more than 500 words, reproduction of one or more figures, tables or other illustrations must have the written permission of the copyright holder of the original work. The permission must be addressed to the author that submitted the manuscript. The rights obtained in secondhand will not be transferred under any circumstances. The direct quoting must be exactly the same used in the original work, even if there are errors/mistakes in the original version. If that happens and there is the chance of making the reader misunderstand what was just said, add the word [sic], underlined and between brackets, right after the error/mistake. When omitting a material from an original source it must be

started by ellipsis (...). The insertion of materials, such as personal comments or observations, they should be done putting in brackets. The emphasis in one or more words should be done with underlined font, followed by [my emphasis].

Attention: Do not use the terms *apud*, *op. cit.*, *id. ibidem*, and others. They do not make part of APA standards (2001, 5th edition).

D. References:

Begin a new page for the Reference section, with the title aligned in the center on the first line below the page heading. Only the works consulted and mentioned in the text should appear in this section. Continue using double space and do not leave an extra space between references. The references should be listed in alphabetical order by last name, according to the standards of the APA (see some examples below). Use the Publication Manual of the American Psychological Association (2001, 5th edition) to verify the rules not mentioned here.

When referring to more than one study by the same author, use chronological order, in other words, from the earliest work to the most recent. The author's names should not be substituted by dashes or underlines.

Examples of references:

1. Articles from scientific journals

Bosa, C. A., & Piccinini, C. A. (1996). Comportamentos interativos em crianças com temperamento fácil e difícil. *Psicologia Reflexão e Crítica*, 9, 337-352.

2. Articles from journals paginated by issue

Proceed according to the example above, and include the number of the issue between parentheses, no underline, after the number of the volume.

3. Articles from an Internet-only journal

Silva, S. C. da (2006, February). Estágios de Núcleo Básico na formação do psicólogo: experiências de desafios e conquistas. *Psicologia para América Latina*, 5, 2006, Retrieved on May 12, 2006, from <http://scielo.bvs-psi.org.br>

4. Books

Koller, S. H. (2004). *Ecologia do desenvolvimento humano: Pesquisa e intervenção*. São Paulo: Casa do Psicólogo.

5. Chapter in an edited book

Dell'Aglio, D. D., & Deretti, L. (2005). Estratégias de *coping* em situações de violência no desenvolvimento de crianças e adolescentes. In: C. S. Hutz (Ed.), *Violência e risco na infância e adolescência: pesquisa e intervenção* (pp. 147-171). São Paulo: Casa do Psicólogo.

6. Republished and re-edited works

Bronfenbrenner, U. (1996). *A ecologia do desenvolvimento humano: experimentos naturais e planejados*. Porto Alegre: Artes Médicas. (Original work published 1979).

7. Corporate Author

American Psychiatric Association (1988). *DSM-III-R, Diagnostic and statistical manual of mental disorder* (3rd. Rev. ed.). Washington, DC: Author.

E. Appendixes: Avoid when possible. Include them only if they issue significant information, such as unpublished tests or the description of equipment or complex materials. Use a new page for each appendix. Appendixes should be indicated in the text and presented at the end of the manuscript, identified by the letters of the alphabet in capital letters (A, B, C, and so forth).

F. Footnotes: They should always be avoided when possible. However, if there is no other possibility, they should be indicated by Arabic numerals in the text and presented after the Appendixes. The title (Footnotes) appears aligned in the center on the first line below the page heading. Indent the first line of each footnote 1,25cm and number them according to the respective indications in the text.

G. Tables: They must be elaborated in Word (.doc) or Excel. In the case of graphical presentations of tables, preferably, use columns, avoiding other forms of presentation such as *pizza*, etc. In these presentations avoid using colors. Each table begins on a separate page. The word Table is aligned to the left on the first line below the page heading and followed by the number correspondent to the table. Use double space and type the

title of the table on the left, in italic and with no period, with the first letter of each word in uppercase letters. They should not exceed 17,5 cm in width by 23,5 cm in length.

H. Figures: Figures should be presented on a separate page, using only JPG format. Do not exceed 17,5 cm in width by 23,5 cm in length. The title Figure is double-spaced below the heading, aligned to the left. Write Figure 1 (or 2, or 3, and so on), in italic, followed by the text of the caption, which should be in italic and with no period. The first letter of each word should be in uppercase letters.

The words Figure, Table and Appendix that appear in the text must be written with the first letter capitalized followed by the number (for Figures and Tables) or letter (for Appendixes) to which they refer. The use of expressions such as "the Table above" or "the Figure below" should not be used because in the editing process they may be placed somewhere else. The standards of APA (2001, 5th edition) do not include the denomination Charts or Graphs, only Tables and Figures.

ATTENTION: The entirety of the PRC editorial process is performed online on the Internet at the site <http://www.seer.ufrgs.br/index.php/PsicReflexaoCritica>. Manuscripts that are forwarded by post mail, fax, e-mail or any other form other than online submissions will not be considered by the Editors.

Peer review process

Manuscripts submitted online to <http://www.seer.ufrgs.br/index.php/PsicReflexaoCritica> and which are in accordance with the standards of the journal and are considered potentially publishable by PRC will be forwarded by the Editor to Associated Editors or to Ad-Hoc reviewers. Associate Editors, in turn, will forward manuscripts to specialists in their field (Ad-Hoc reviewers or Councilors - members of the Editorial Board).

Reviewers may recommend to Editors that the manuscripts be accepted without modifications, accepted conditioned by modifications, or rejected. The identity of reviewers is withheld from authors. Authors will have access to copies of the reviewer's judgment and their justifications.

Manuscripts forwarded to reviewers will not have the author's identification.

The modified version will be reviewed by a Councilor, who may request as many modifications as necessary for the final acceptance of the manuscript. The Editor will always give the final decision on publishing, or not, a manuscript. The author's identity, at this point, may be informed to the Councilor.

The Councilor reserves the right to apply slight modifications to the author's text so to expedite the publication process. The Editorial Committee will settle specific cases.

Authors can follow all the stages of the editorial process on the Internet (<http://www.seer.ufrgs.br/index.php/PsicReflexaoCritica>).

The names of the reviewers that collaborated in selecting manuscripts will appear in the last edition of the year, without specifying which texts were individually analyzed.

Before forwarding to the printer the accepted manuscripts, the Editor will send a proof to the author(s) for proofreading. The authors have five working days to proofread the manuscript and return it to the Editor. If the authors do not return the proof without any alterations, the manuscript will be published according to the proof.

At this stage of the process, the author(s) whose manuscript has been accepted must send a letter assigning copyrights to the journal. And, when pertinent, the journal may request, from the author(s) of research reports, a copy of the project's approval by an ethic committee.

The manuscripts that have been accepted and edited will be available online "in press", that is, before the printed edition is released.

Regarding the printed version, the main author will receive 1 copy. Extra copies or reprints are not provided, but authors and co-authors can obtain online copies from the site of **Psicologia: Reflexão e Crítica/Psychology** at [SciELO](http://www.scielo.org).

Psicologia: Reflexão e Crítica offers public access to all of its contents, following the principle that offering free access to research generates greater global exchange of knowledge. Such access is associated to the increase of reading and citation of author references. For more information on this, visit [Public Knowledge Project](#), the project which developed this system in order to improve the quality of academic and public research, distributing the Open Journal System, other academic publishing mediums, as well as other supporting software for the public access publication system. Our journal encourages authors to make available in their personal and institutional sites PDF files with the final version of the articles, since they are already free of any commercial and profitable means.

Publication Fee

Since June 1st, 2012 the journal PRC is charging a publication fee which must be paid by the authors who have had their article(s) approved. PRC has grown in quality and recognition. In order to be able to invest in improvements and in the expansion of the journal, the new publication fee was implemented, complementing the resources received from agencies such as CNPQ and the Graduate Program in Psychology - UFRGS.

To start the process of electronic submission, the author needs to send an e-mail (see Step 1 'Instructions to Authors' at SEER UFRGS system) stating to be aware of the payment of the fee. The amount charged for the publication of original articles will be of R\$ 350,00 (US\$ 175.00). When the manuscript is accepted, the author will receive a warning note regarding the payment. It can be made at Banco do Brasil, agency 3798-2, bank account 300.000-1, identification code 3699-4. If the author prefers, the payment can be made via PayPal (<http://www.scielo.br/revistas/prc/www.paypal.com>) being <mailto:bandeira@ufrgs.br> the target e-mail address. After making the deposit, the voucher must be submitted within 15 days by e-mail (<mailto:prcrev@ufrgs.br>) or attached at SEER UFRGS system in 'supplementary documents'. In this case, the secretary must be informed of the payment. In case of any doubt, the author may get in touch with the journal by phone ([+55 51 33085691](tel:+555133085691)).

