



Avaliação dos efeitos do flavonóide morina sobre a memória de animais normais e com Alzheimer induzido por D-galactose

Evaluation of the effects of the flavonoid morin on the memory of normal animals and Alzheimer's induced by D-galactose

Recebido em 21/10/2010

Aceito em 15/08/2011

Stefany Andrade Serrão¹, Carla Jane Weber², Philipe Costa¹, Márcia Maria de Souza^{1*}

¹Curso de Farmácia/Universidade do vale do Itajaí, UNIVALI, Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), 88302202, Itajaí, SC, Brasil

²Curso de Biotecnologia/Universidade do vale do Itajaí, UNIVALI, Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), 88302202, Itajaí, SC, Brasil

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela progressiva perda de memória, seguida por demência. Na DA ocorrem distúrbios bioquímicos decorrentes da formação das placas senis pelos agregados da proteína A β , que provocam disfunções como o estresse oxidativo, inflamação, citotoxicidade e apoptose, culminando na neurodegeneração. Os flavonóides são compostos naturais que desempenham diversas propriedades farmacológicas, sobretudo a atividade antioxidante. A morina (MOR) é um representante da classe com efeito ativo no metabolismo bioquímico exercendo ação antioxidante. O objetivo do presente estudo foi avaliar efeitos da MOR sobre a memória de animais normais e com Alzheimer induzido por D-galactose (D-GAL) através do modelo da esQUIVA inibitória. Para avaliar os efeitos da MOR (50 e 100mg/Kg, v.o.) sobre a aquisição, consolidação da memória de animais normais, ratas (250-300g) foram tratadas com o composto respectivamente e/ou veículo 60 minutos antes e imediatamente após a sessão de treino ou 60 minutos antes da sessão de teste, sendo avaliados 24hs após o treino. Decorridos 24hs do testes da esQUIVA inibitória, os animais tiveram o mesmo tratamento e foram testados nos modelos do campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevado (LCE) para verificar o efeito dos mesmos sobre a performance motora e sobre a ansiedade dos animais. Para indução da DA, os animais foram tratados com D-GAL (100 mg/kg, i.p.) por 8 semanas. Após a indução, receberam tratamento com MOR (25, 50 e 100 mg/kg), Rivastigmina (0,5 mg/kg) e veículo sendo então submetidos aos testes de memória. Em animais normais a MOR (100mg/Kg, v.o.) quando comparado com o controle, produziu facilitação da consolidação da memória dos mesmos [MOR100 = 180(75-180)s/VEIC 74(36-135)s], sem alterar a aquisição e a evocação. Em animais com a DA induzida por D-GAL, o composto e a Rivastigmina reverteram o déficit cognitivo dos mesmos em todas as doses utilizadas ([MOR25= 133,5(113-180)/ MOR50= 180(180-180)s/ MOR100= 169,5(78-180)s/RIV= 148,6(85-175)s/ VEIC= 27(21-32)s]. Os resultados também demonstram que o tratamento com a MOR não afeta a performance motora e o grau de ansiedade dos animais quando avaliados no modelo do CA e LCE. Os resultados em conjunto sugerem que a MOR facilita a consolidação da memória em animais normais e, mais interessante, reverte o déficit cognitivo dos animais com DA induzida por D-GAL. Estudos estão sendo realizados para investigar o mecanismo de ação do flavonóide.

Palavras-chave: Memória, morina, Alzheimer

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive memory loss, followed by dementia. Biochemical disturbances occur in AD due to formation of senile plaques by the A β protein aggregates that cause disorders such as oxidative stress, inflammation, cytotoxicity and apoptosis, culminating in neurodegeneration. Flavonoids are natural compounds that perform various pharmacological properties, especially the antioxidant activity. The morin (MOR) is a compound representative of the class with an active effect on the biochemical metabolism exerting antioxidant action. The

* **Contato:** Márcia Maria de Souza, Centro de Ciências da Saúde, UNIVALI 88302-202, Itajaí, SC, Brasil, +55 47 3341-7500 ramal 8066, e-mail: msouza@univali.br

purpose of this study was to evaluate the effects of MOR on the memory of normal animals or with AD induced by D-galactose (D-GAL) through the model of inhibitory avoidance. To evaluate the effects of MOR (50 and 100mg/kg, po) on the acquisition, memory consolidation from normal animals, rats (250-300g) were treated with the compound, or vehicle respectively, 60 min before and immediately after the session training or 60 minutes before the test session and were assessed 24 hours after session training. After 24 hours of the inhibitory avoidance testing, animals had the same treatment and were tested in models of the Open Field (OP) and elevated plus maze (EPM) to evaluate the effect this compound on motor performance and the anxiety. For induction, of DA the animals were treated with D-GAL (100 mg / kg, ip) for 8 weeks. After induction, were treated with MOR (25, 50 and 100 mg / kg), rivastigmine (0.5 mg / kg) or vehicle and underwent tests of memory. In normal animals the MOR (100mg/kg, po) when compared with the control, produced facilitation of memory consolidation of the same [MOR100 = 180 (75-180)s/ VEH= 74 (36-135) s], without changing the acquisition and retrieval. In animals with DA induced by D-GAL, rivastigmine and the compound reversed the cognitive deficits of the same at all doses used ([MOR25 = 133.5 (113-180)/ MOR50 =(180-180) s / MOR100 = 169.5 (78-180) s / RIV = 148.6 (85-175) s/VEH = 27 (21-32) s]. The results also show that treatment with the MOR does not affect motor performance and degree of anxiety when evaluate in OP e EPM. The results together suggest that MOR facilitates memory consolidation in normal animals and, more interestingly, reverses the cognitive deficits of animals with DA induced by D-GAL. Studies are being carried out to investigate the mechanism of action of the flavonoid.

Keywords: Memory, morin, Alzheimer

INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela irreversível e progressiva perda de memória, diminuição do desempenho nas atividades diárias, seguida pela completa demência. A primeira estrutura cerebral atingida pela DA é o hipocampo, posteriormente a progressão da doença afeta as outras estruturas cerebrais levando aos sintomas da demência (Candore *et al.*, 2010). As alterações patológicas da DA caracterizam-se pela deposição extracelular da proteína beta-amilóide (A β) formando as placas senis, e fosforilação da proteína TAU, acompanhadas de perda neuronal, particularmente em neurônios colinérgicos (Walsh & Selkoe, 2004). Diversos estudos demonstram que os déficits de memória são característicos na DA são consequência de desequilíbrios entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante disponível no cérebro. Além disso, o acúmulo de proteínas oxidadas no cérebro potencializa a neurodegeneração e diminui as funções cognitivas (Corbetta *et al.*, 2008). A patogênese da DA envolve estresse oxidativo e resposta inflamatória neuronal (Glass *et al.*, 2010), e seu risco é reduzido com o aumento do consumo de substâncias antioxidantes (Devore *et al.*, 2010).

Compostos polifenólicos, como os flavonóides Kaempferol, Morina e Miricetina tem sido estudados, apresentando ação antioxidante e, portanto, protetora do SNC em modelos de indução de DA (Coentrão, 2011). Muito recentemente foi reportado que a morina exibe capacidade de anti-agregação sobre peptídeos beta-amilóide (A β) formadores das placas senis (Lemkul & Bevan, 2010), colocando esse composto como um possível candidato a fármaco na terapêutica da DA, sem os inconvenientes efeitos adversos apresentados pelos medicamentos anticolinesterásicos, única opção de tratamento da doença

Diversos estudos farmacológicos revelam que o flavonóide morina (MOR) possui inúmeras atividades biológicas estudadas (Marques, 2004) destacando-se a atividade antioxidante (Sreedharan *et al.*, 2009) em siste-

mas periféricos, podendo inibir o estresse oxidativo e a enzima β -secretase *in vitro*, impedindo a formação da proteína β -amilóide (Shimmyo *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que a administração contínua de injeções de D-Galactose (D-GAL), em roedores, tem a propriedade de produzir radicais livres. Também foi observado, que o tratamento com a D-GAL leva á uma redução na expressão de proteínas, deterioração do aprendizado e funções da memória associados com a diminuição do sistema colinérgico no córtex cerebral (Hua *et al.*, 2007). Já foi demonstrado experimentalmente que animais tratados com D-GAL apresentam deposição de proteína beta-amilóide (A β) formando as placas senis, acompanhadas de perda neuronal as quais ocorrem em decorrência do envelhecimento, mas muito mais acentuada em portadores da DA. Além disso, D-GAL pode causar a acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), ou estimular a produção de radicais livres através da formação de produtos de glicação avançada (Cui *et al.*, 2006). D-GAL prejudica processos de neurogênese em regiões cerebrais como o giro denteado, de forma semelhante ao que ocorre naturalmente durante o envelhecimento (Parameshwaran *et al.*, 2011). Diante disso, o tratamento de roedores com D-GAL tem sido utilizado como um modelo animal de envelhecimento e indução de DA (Li *et al.*, 2011). A proposta central do presente estudo foi estudar os efeitos da MOR sobre as etapas da memória (aquisição, consolidação e evocação) bem como, verificar se o composto poderia reverter os déficits cognitivos em animais com Alzheimer induzido por D-GAL.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e tratamento

Para os ensaios farmacológicos foram utilizados ratos Wistar fêmeas (peso entre 250-300g), mantidos a 22 \pm 1°C com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h exceto durante os ensaios farmacológicos. Os animais eram trazidos para o local dos experimentos por no mínimo 2h antes dos mesmos para ambientação. Os

ensaios farmacológicos foram realizados segundo os princípios éticos de Boas Normas de Experimentação, após o projeto ser analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP/UNIVALI) com parecer 390/2009. Como controle negativo foi utilizado o veículo no qual a MOR (Sigma, Aldrich, EUA) foi dissolvida (solução salina 0,9% com Tween 80 em uma concentração de 2,0%) e como controle positivo foram utilizados a rivastigmina. As doses utilizadas e o número de animais por grupo de tratamentos foram baseados em dados da literatura (Bejar et al., 2009).

Indução do Alzheimer pelo modelo de D-galactose

Cinco grupos de animais (N=10) receberam diariamente D-GAL (100 mg/kg/animal, i.p.). Dos 5 grupos, 3 deles receberam durante as 2 últimas semana de tratamento com a D-GAL, MOR (25, 50 e 100 mg/kg). O quarto grupo recebeu Rivastigmina 0,5 mg/kg (v.o.), fármaco de referência utilizado para o tratamento de Alzheimer. Um quinto grupo recebeu D-GAL e o veículo no qual a MOR foi dissolvida como controle negativo. O tratamento dos grupos ocorreu durante um período de 8 semanas. Decorrido o período de indução da DA por D-GAL, os grupos de animais com tratamentos foram utilizados nos testes de memória. Para tanto, decorrido 24hs do último dia de tratamento, os animais foram treinados e imediatamente tratados com a MOR, e controles para 24hs após serem avaliados.

Esquiva Inibitória (MEI)

O aparelho utilizado é uma caixa medindo 50 cm de comprimento, 25 de largura e 25 de altura. Parte da base do aparelho possui grades com barras de bronze de 1 mm de diâmetro, com espaço de 1 cm. Na sessão de treino, cada animal foi colocado sob a plataforma, acionou-se o cronômetro e cronometrou-se a latência de descida completa do animal da plataforma (com as quatro patas na grade de bronze). Quando isto ocorreu, o animal recebeu choques (0,4 mA^o) por um período de 2 segundos e 24 horas depois (sessão de teste) foi realizado com cada animal treinado o mesmo procedimento descrito anteriormente, com omissão dos choques. As diferenças entre as sessões de treino e teste foram consideradas índices de memória (Izquierdo, 2002). Os animais receberam os tratamentos, respectivamente 60 minutos antes, imediatamente após a sessão de treino e, 60 minutos antes das sessões de teste, para verificação do efeito do composto sobre a aquisição, consolidação e evocação da memória.

Modelo do Campo aberto (CA)

Com o objetivo de verificar se a MOR pudesse afetar o sistema motor dos animais e, comprometer os resultados referentes ao comportamento de cada um no MEI, foi utilizado o CA. Decorrido 60 minutos após o tratamento com a MOR e/ou controles, os animais foram transferidos para um aparato de acrílico transparente, com o assoalho dividido em 9 quadrantes. Durante o período de 6 minutos cada animal foi observado e o número de cruzamentos entre os quadrantes (*crossings*) bem como o número de pos-

turas de exploração (*rearings*) foram contados cumulativamente (De-Souza et al., 2006).

Labirinto em cruz elevado (LCE)

Com o objetivo de verificar se o grau de ansiedade nos animais poderia influenciar nos efeitos da MOR sobre a memória, os animais foram primeiramente testados no modelo do LCE. O LCE é constituído de madeira, em forma de cruz grega, com dois braços abertos (30 x 5 x 0,2 cm), e dois fechados (30 x 5 x 15 cm), os braços são conectados por uma área central aberta (5 x 5 cm) e elevado a uma altura de 45 cm sobre o chão. Os animais foram colocados no centro do LCE voltados para um dos braços fechados para observação durante 5 minutos. Durante esse tempo, foram registradas as frequências de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo gasto para exploração desses braços (De-Souza et al., 2006). Os tratamentos com MOR e controles foram feitos 60 minutos antes do teste do LCE.

Análise estatística

A análise estatística dos dados da latência de descida da plataforma, no teste da esQUIVA inibitória, foi realizada por análise de variância (ANOVA) não paramétrica de uma via (Kruskal-Wallis). A análise post hoc dos dados foi feita por meio do teste não-paramétrico de comparações múltiplas Dunns. Os resultados estão apresentados como medianas seguidas dos intervalos interquartil (25-75%). No teste do CA e LCE os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e uma via. A análise post hoc foi feita utilizando o teste de Newman Keuls. Todos os dados foram analisados através do software GraphPad Prism®, sendo considerados estatisticamente significantes os valores de p menor do que 0,05 (p<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão representados os efeitos do pré-tratamento MOR sobre as etapas da memória (aquisição, consolidação e evocação) de animais normais avaliados no modelo da esQUIVA inibitória. Os resultados demonstram que, quando comparados com o grupo controle (tratados com veículo), na sessão de teste, o pré tratamento com a MOR (100 mg/kg) promoveu de forma estatisticamente significativa (p<0,05) a facilitação do aprendizado da tarefa de esQUIVA inibitória, [MOR= 180(75-180)s / VEIC= 74(36-135)s], melhorando a fase de consolidação (Figura 1B).

Os resultados também demonstram que o tratamento dos animais com a MOR quando comparado ao grupo controle não altera o desempenho motor dos mesmos, o qual é representado pelo número de cruzamentos (*crossings*) (MOR50=89,6±3,14/MOR100=121,6±4,10/VEIC=118,5±4,16) (p>0.05) e, o número de posturas de exploração (*rearings*) (MOR50= 48,6±3,64 / MOR100= 46,6±4,18 / VEIC= 50,5±2,16) (p>0.05) quando avaliados no modelo de deambulação, o teste do CA (Figura 2A e B).

No modelo do LCE (Tabela 1) também se observa que os parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade, não são alterados com o tratamento dos animais com a MOR quando comparados com o grupo controle (p>0,05).

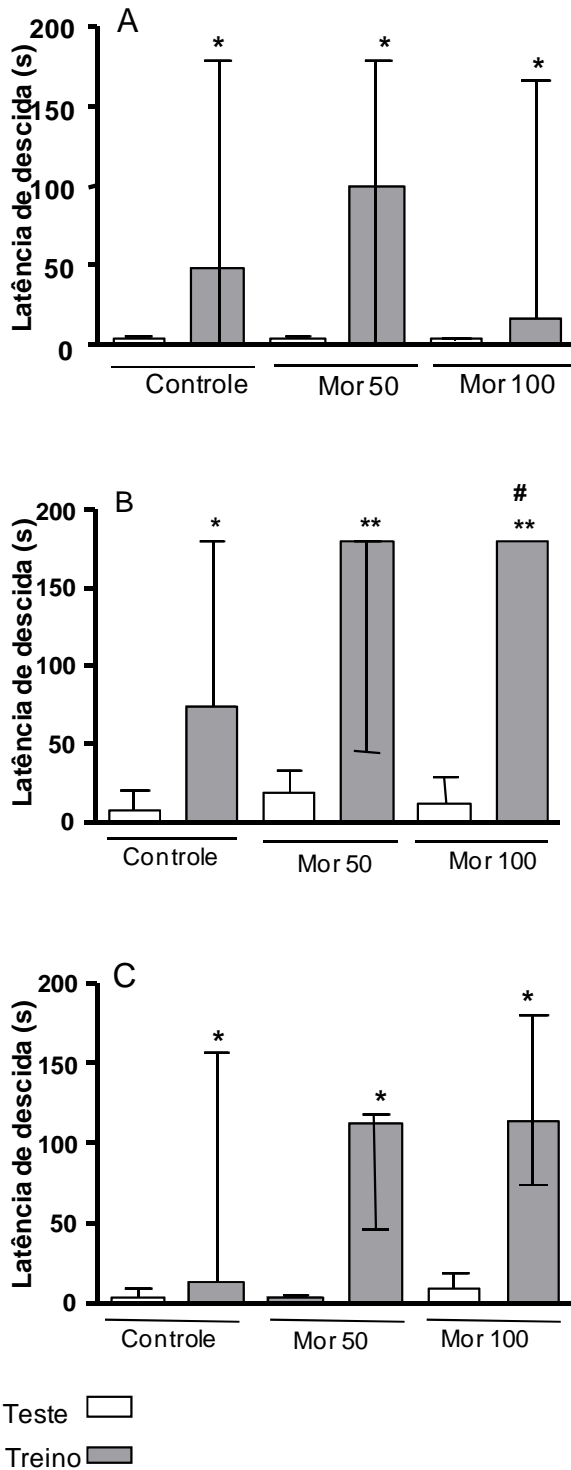


Figura 1. Efeito da administração oral da MOR (50-100 mg/kg) sobre a aquisição (A), consolidação (B) e evocação (C) da memória de animais normais submetidos ao teste da esquiwa inibitória. Colunas brancas representam sessões de treino e colunas cinza representam sessões de teste. Asteriscos denotam significâncias estatísticas quando comparado com sessão de treino com mesmo tratamento (* p<0.05, **p<0.01) e # denotam diferenças estatísticas quando comparado com controle na sessão de teste #p<0.05). Em cada coluna os dados são expressos como medianas seguidas dos intervalos interquartis (25-75). ANOVA seguida do post hoc de Dunns entre grupos.

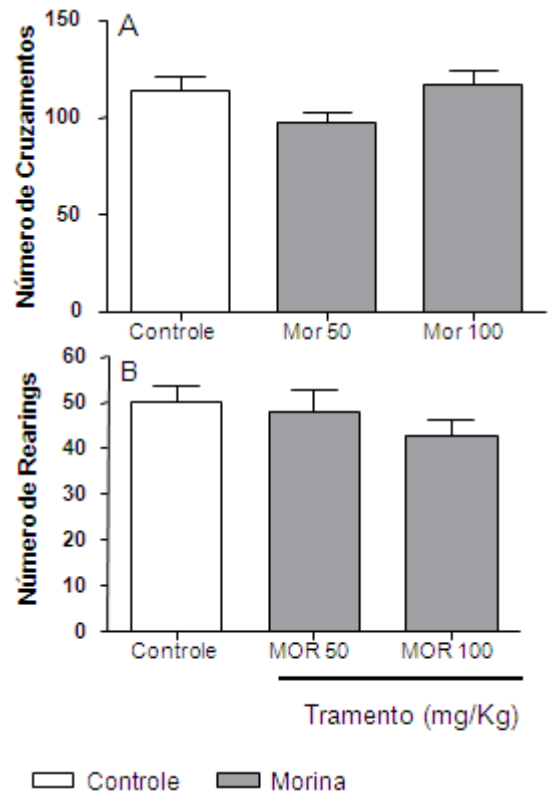


Figura 2. Efeito da administração da MOR nas doses de 50 e 100 mg/kg (v.o.) sobre os parâmetros: número de cruzamentos (A) e número de rearings (B). Cada coluna representa a média de 10 animais e as barras verticais indicam os erros padrões da media (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguidos pelo teste de Dunnett.

Os resultados em conjunto demonstram que o efeito facilitador da memória induzido pela MOR em animais normais não foram influenciados pelo grau de ansiedade como mostrado no LCE, tão pouco, por efeitos no sistema motor dos mesmos, como demonstrado através do modelo do CA.

Os resultados referentes aos efeitos do tratamento da MOR e da rivastigmina em animais com DA induzida por D-GAL estão representados na Figura 3. Avaliando o desempenho dos animais nas sessões de treino e de teste, os resultados apresentados demonstram que o tratamento com D-GAL promove déficit cognitivo nos animais uma vez que o grupo controle, não aprende a tarefa da esquiwa-inibitória [Tr= 17,50 (2-17)s / Tes= 19(1-22)s] (p>0.05). Entretanto, avaliando os resultados obtidos das sessões de teste, verifica-se que o tratamento dos animais com MOR e a rivastigmina revertem de forma estatisticamente significativa o déficit cognitivo induzido por D-GAL em todas as doses utilizadas [MOR25= 133.5 (113-180)s / MOR50= 180(180-180)s / MOR100= 169.5 (78-180)s / RIV= 148.6 (85-175)s, VEI= 19 (1-22) s]. Os resultados indicam que o efeito da MOR podem ser superiores ao efeito da rivastigmina, (fármaco usado no tratamento da DA) dependendo da dose utilizada.

Tabela 1. Efeito do tratamento da MOR sobre a ansiedade em animais submetidos ao LCE

Desempenho no LCE – Animais tratados com MOR e veículo				
	Número de entradas nos braços abertos (%)	Número de entradas nos braços fechados (%)	Tempo gasto nos braços abertos (%)	Tempo gasto nos braços fechados (%)
Veículo	47,5 ± 3,0	52,4 ± 3,0	49,3 ± 4,5	50,6 ± 4,5
Morina 25 mg/kg	37,7 ± 4,7 ^(ns)	62,3 ± 4,7 ^(ns)	37,7 ± 4,1 ^(ns)	62,3 ± 4,1 ^(ns)
Morina 50 mg/kg	37,1 ± 3,6 ^(ns)	62,8 ± 3,6 ^(ns)	36,4 ± 5,42 ^(ns)	63,6 ± 5,4 ^(ns)
Morina 100 mg/kg	45,2 ± 2,6 ^(ns)	54,7 ± 2,6 ^(ns)	52,6 ± 1,6 ^(ns)	47,4 ± 1,6 ^(ns)

Cada grupo representa a média de 10 animais seguidas dos E.P.Ms. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguidos pelo teste de *Dunnett*; ^(ns) – Não significativo ($p > 0.05$) quando comparado com o grupo controle (veículo).

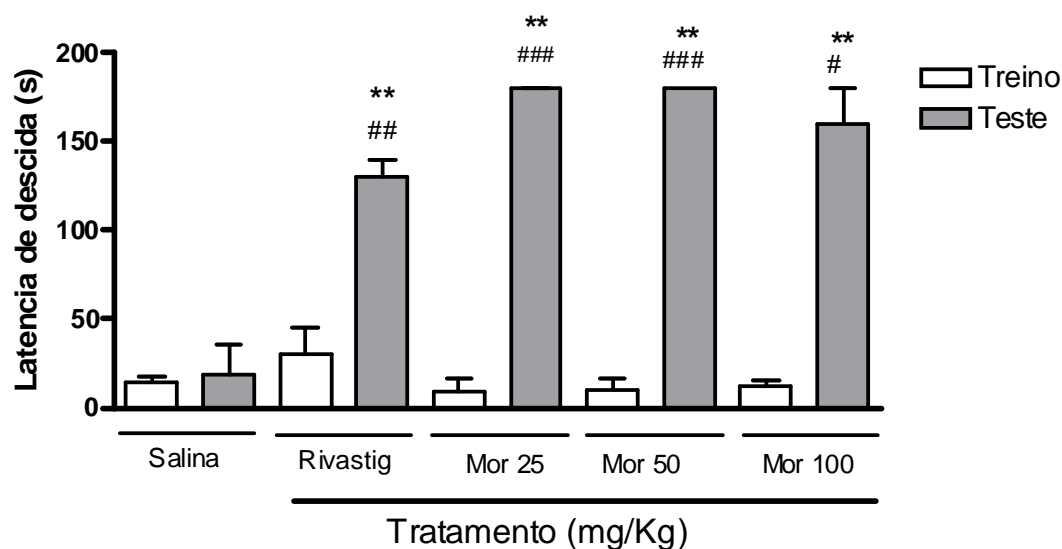


Figura 3. Efeito da administração oral da morina (MOR) (25, 50 e 100 mg/kg, v.o.) e rivastigmina (0.5mg/kg, v.o.) sobre a memória de animais com Alzheimer induzido com D-galactose e avaliados no teste da esquiwa inibitória. Colunas brancas representam as sessões de treino e as colunas cinza representam sessões de teste. Asteriscos denotam significâncias estatísticas quando comparado com sessão de treino com mesmo tratamento (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) e # denotam diferenças estatísticas quando comparado com controle na sessão de teste (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$). Em cada coluna os dados são expressos como medianas seguidas dos intervalos interquartis (25-75). ANOVA seguida de Kruskal-Wallis entre treinos e testes e teste de Mann-Whitney e Dunns entre grupos.

Os flavonóides são uma família de difenilpropanos mais encontrados em uma variedade de frutas, verduras, sucos e suplementos dietéticos. Tais compostos também são considerados os ingredientes ativos de algumas plantas medicinais e os efeitos dos mesmos podem ser fisiologicamente significativos (Bouaziz *et al.*, 2010). Em adição, flavonóides e outros compostos polifenólicos derivados de plantas tem recentemente despertado o interesse do público, uma vez que podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares (Scholz *et al.*, 2010). O interesse na investigação de flavonóides decorre de suas propriedades biológicas, as quais incluem principalmente a atividade de *scavengers* (lixeiros) de radicais de oxigênio e antioxidantes (Liu & Schubert, 2009).

A morte de neurônios por estresse oxidativo tem sido implicada em uma variedade de patologias, incluindo acidente vascular cerebral, traumas e doenças como

Alzheimer e Parkinson (Devore *et al.*, 2010). A MOR (3, 5, 7, 2', 4' pentahidroxiflavona) é um membro da família dos flavonóides, encontrado em diversas plantas como *Prunus dulcis*, *Chlorophora tinctoria* e outras espécies da família moraceae utilizadas como alimento e na medicina popular (Xie *et al.*, 2006). Tem sido relatado que o composto possui uma variedade de propriedades biológicas contra o estresse oxidativo induzido por danos, incluindo a proteção de células cardiovasculares e células glomerulares (Zeng *et al.*, 1994), hepatócitos (Sivaramakrishnan, *et al.*, 2008), oligodendrócitos e neurônios (Zhang, *et al.*, 2009, Ibarretxe *et al.*, 2006). O composto também possui efeito inibitório sobre a enzima β -secretase *in vitro*, impedindo a formação da proteína β -amilóide (Shimmyo *et al.*, 2008). Mais recentemente, foi reportado que a MOR exibe capacidade de anti-agregação sobre peptídeos beta-amilóide (A β) formadores das placas

senis (Lemkul & Bevan, 2010),

Neste estudo foi demonstrado o efeito facilitador da MOR sobre a memória de animais normais confirmando dados da literatura de que flavonóides exibem efeitos nootrópicos como observado em testes experimentais com curcumina (Awasthi *et al.*, 2010), resveratrol, luteolina e kaempferol (Aguirre-Hernández *et al.*, 2009) e quercetina (Bhutada *et al.*, 2010). Embora os flavonóides possam exibir efeito ansiolítico em vários modelos animais de ansiedade (Awasthi *et al.*, 2010) principalmente no LCE, os resultados aqui apresentados demonstram que nas doses utilizadas, a MOR não altera o grau de ansiedade dos animais testados. Tampouco o composto alterou o desempenho motor dos mesmos quando avaliados no modelo do CA. Tais resultados em conjunto nos permitem sugerir que os efeitos do composto sobre a memória dos animais da esQUIVA INIBITÓRIA não sofre interferência do estado de ansiedade dos animais e de alterações motoras.

Por muito tempo a pesquisa de fármacos para a terapêutica da DA, bem como para o entendimento dos mecanismos bioquímicos, genéticos e fisiológicos envolvidos na gênese da doença permaneceram estagnadas por falta de modelos animais específicos, que pudessem ser empregados. Atualmente, vários são os modelos animais existentes como, por exemplo, o modelo da D-GAL aqui utilizado. Como previamente reportando, a D-GAL induz acúmulo de ROS, ou estimula a produção de radicais livres indiretamente, pela formação de endoprodutos de glicação *in vivo*, resultando em estresse oxidativo (Parameshwaran *et al.*, 2011). Também foi demonstrado que a injeção subcutânea de D-GAL em camundongos induz a um aumento dos níveis de proteínas caspases – 3 em neurônios hipocâmpais (Cui *et al.*, 2006), sugerindo que os déficits cognitivos observados em animais e humanos portadores da doença esteja ligado a eventos apoptóticos dos neurônios dessa região. Recentemente, Hua e colaboradores (2007) verificaram que a injeção combinada da D-galactose com a técnica de ovariectomia amplificar os efeitos neurodegenerativos da D-GAL, justificando que a falta de estrógenos pode ser um agravante da doença em mulheres (Hua *et al.*, 2007). Outro modelo que vem sendo bastante utilizado por pesquisadores do mundo inteiro é o modelo do peptídeo humano amilóide A β -1-40. Medeiros e colaboradores (2010) demonstraram que uma única injeção intracerebro-ventricular de A β 1-40, em doses picomolares, induz uma resposta que neuroinflamatória a qual pode estar associada a um declínio na aprendizagem e funções de memória de camundongos (Medeiros *et al.*, 2010).

Outra abordagem que vem sendo feita em termos de modelo de DA é um tipo de neurodegeneração temporária induzida por streptozotocina. A streptozotocina é uma toxina utilizada como ferramenta farmacológica em modelos de diabetes (Saxena *et al.*, 2008) a qual destrói parcialmente as células do pâncreas induzindo a diabetes do tipo I experimental. Ambas as doenças possuem características comuns, incluindo anormalidades do metabolismo da glicose, aumento do estresse oxidativo, resistência à insulina e amiloidogênese (Coker & Wagenknecht, 2011).

Neste estudo, nos animais com DA induzida por D-GAL

observa-se que os mesmos não conseguem consolidar a memória da esQUIVA INIBITÓRIA, o qual é evidenciado comparando-se as sessões de treino e teste dos animais tratados com veículo. Entretanto, o tratamento desses animais com a MOR nas duas últimas semanas de indução do processo neurodegenerativo com a D-GAL, reverteu o déficit cognitivo dos animais com todas as doses utilizadas. No experimento também se observou que a rivastigmina produz reversão do déficit cognitivo dos animais com DA. O efeito anti-Alzheimer da rivastigmina ocorre devido a inibição da enzima AChE (enzima que degrada a ACh) aumentando portanto, as concentrações do neurotransmissor nas sinapses colinérgicas (Forlenza, 2005).

O mecanismo pelo qual a MOR previne o déficit cognitivo dos animais com Alzheimer induzido com D-GAL não foi aqui investigado. Entretanto, com base na literatura vigente, pode-se sugerir que o efeito observado poderia estar relacionado às propriedades antioxidante do composto, ou, com uma possível atividade antiinflamatória sobre o sistema nervoso central. Na DA, inflamação e estresse oxidativo são processos que estão co-relacionados (Candore *et al.*, 2010) e, os efeitos antiinflamatório e antioxidante já do composto em estudo foram anteriormente detectados (Lemkul *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009).

CONCLUSÃO

Os achados deste estudo permitem concluir que a MOR exibe efeito facilitatório sobre a memória de animais normais. Porém, em animais com DA induzido por D-GAL, o efeito é melhor observado. O tratamento com o flavonóide foi capaz de reverter os déficits cognitivos dos animais de forma significativa sugerindo que o composto apresenta propriedades neuroprotetoras. Os resultados em conjunto, corroboram com outros já descritos, relacionados aos efeitos neuroprotetores de compostos polifenólicos em processos neurodegenerativos. Outros experimentos estão sendo conduzidos para determinar os mecanismos pelos quais a MOR exibe esse efeito neuroprotetor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao programa PROBIc/UNIVALI pela bolsa de iniciação científica da acadêmica de Farmácia Stefany Andrade Serrão e a FAPESC/SC e CNPq/ Edital UNIVERSAL 2008 pela aprovação de projetos que culminaram neste e em outros trabalhos científicos.

REFERÊNCIAS

Aguirre-Hernández E, González-Trujano ME, Martínez AL, Moreno J, Kite G, Terrazas T, Soto-Hernández M. HPLC/ms analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. mexicana. *J. Ethnopharmacol.* 127(1): 91-97, 2009.

- Awasthi H, Tota S, Hanif K, Nath C, Shukla R. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. *Life Sci.* 16(86): 87-94, 2010.
- Bejar C, Wang H, Weinstok M. Effects of rivastigmine on scopolamine – induced memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 383(1): 231-240, 2009.
- Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Bhutada C, Tawari S, Dixit P. Ameliorative effect of quercetin on memory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurobiol. Learn Mem.* 54(1): 45-48, 2010.
- Bouaziz M, Jemai H, Khabou W, Sayad IS. Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. *J. Sci. Food Agric.* 15(90): 1750-1758, 2010.
- Candore G, Bulati M, Caruso C, Castiglia L, Colonna-Romano G, Di Bona D, Duro G, Lio D, Matranga D, Pellicanò M, Rizzo C, Scapagnini G, Vasto S. Inflammation, cytokines, immune response, apolipoprotein E, cholesterol, and oxidative stress in Alzheimer disease: therapeutic implications. *Rejuvenation Res.* 13(2-3): 301-313, 2010.
- Coentrão P, Teixeira VL, Netto AD. Antioxidant activity of polyphenols from green and toasted mate tea. *Nat. Prod. Commn.* 6(5): 651-656, 2011.
- Coker LH & Wagenknecht LE. Advanced glycation end products, diabetes, and the brain. *Neurology* 23(3): 234-239, 2011.
- Corbetta M, Patel GH, Shulman GL. The reorienting system of the human brain: from environment to theory of mind. *Neuron.* 58: 306-324, 2008.
- Cui X, Zuo P, Zhang Q, Li X, Hu Y, Long I. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: Protective effects of R-alpha-lipoic acid. *J. Neurosci. Res.* 83(8): 1584-1590, 2006.
- De-Souza MM, Garbeloto M, Denez K, Eger-Mangrich, I. Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16(3): 365-371, 2006.
- Devore EE, Grodstein F, Van Rooi JFJ, Hofman A, Stampfer J, Witteman JC, Breteler MM. Dietary antioxidants a long-term risk of dementia. *Arch. Neurol.* 67(7): 819-825, 2010.
- Forlenza OV. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Rev. Psiq. Clin.* 32: 137-148, 2005.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage F. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell.* 140: 918-934, 2010.
- Hua X, Lei M, Zhang Y, Ding J, Han Q, Hu Q, Xiao M. Long-term D-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. *Life Sci.* 80: 1897-1905, 2007.
- Ibarretxe G, Sánchez-Gómez MV, Campos-Esparza MR, Alberdi E, Matute, C. Differential oxidative stress in oligodendrocytes and neurons after excitotoxic insults and protection by natural polyphenols. *Glia* 53: 201-211, 2006.
- IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: Artmed, 2002. 95 p.
- Jung HJ, Kim SJ, Song YS, Parrk EH, Lim CJ. Evaluation of the antiangiogenic, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of morin. *Planta medic.* 76(3): 273-275, 2009.
- Lemkul MJA & Bevan DR. Destabilizing Alzheimer's A β ₄₂ protofibrils with morin: mechanistic insights from molecular dynamics simulations. *Biochemistry.* 49(18): 3935-3946, 2010.
- Li L, Ding J, Marshall C, Gao J, Hu G, Xiao M. Pretraining affects Morris water maze performance with different patterns between control and ovariectomized plus D-galactose-injected mice. *Behav. Brain Res.* 217(1): 244-247, 2011.
- Liu Y & Schubert DR. The specificity of neuroprotection by antioxidants. *J. Biomed. Sci.*, 5(3): 16-98, 2009.
- Marques CP. *Efeitos da morina sobre a memória de reconhecimento e esquia inibitória em ratos.* 2004. Porto Alegre. 42p. Dissertação de mestrado. PUCRS, 2004.
- Medeiros R, Figueiredo CP, Pandolfo P, Duarte FS, Prediger RS, Passos, GF, Calixto JB. The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. *Behav. Brain Res.* 209(1): 165-173, 2010.
- Parameshwaran K, Irwin MH, Stelious K, Pinkert CA. D-galactose effectiveness in modeling aging and therapeutic antioxidant treatment in mice. *Rejuvenation Res.* 13(67): 29-35, 2011.
- Saxena G, Singh RA, Chandishwar N, Sheelendra, P. Effect of donepezil and tacrine on oxidative stress in intracerebral streptozotocin- induced model of dementia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 581(3): 283-289, 2008.
- Scholz EP, Zitron E, Katus HA, Karle CA. Cardiovascular ion channels as a molecular target of flavonoids. *Cardiovasc. Ther.* 28(4): 46-52, 2010.
- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: Structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochimic. et Biophys. Acta* 1780: 819-825, 2008.

Sivaramakrishnan V, Shilpa PNM, Kumar VRP, Devaraj SN. Attenuation of *N*-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinogenesis by a novel flavonol-Morin. *Chem. Biol. Interact.* 88: 171-179, 2008.

Sreedharan V, Venkatachalam KK, Namasivayam N. Effect of morin on tissue lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Invest. New Drugs* 27: 21-30, 2009.

Walsh DM & Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron.* 44: 181-193, 2004.

Xie MX, Long M, Liu Y, Qin C, Wang YD. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 1184-1191, 2006.

Zeng LH, Fung KP, Wu TW. Morin hydrate protects cultured rat glomerular mesangial cells against oxyradical damage, *Life Sci.*, 55: 351-357, 1994.

Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Maeng YH, Lee KH, Chang WY, You HJ, Kim JS, Kang SS, Hyun JW. Cellular protection of morin against the oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Chemic-Biological Interac.* 177(1): 21-27, 2009.