

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**TESE**

**DISFUNÇÃO COGNITIVA CANINA: ESTUDO DE NOVAS  
ABORDAGENS TERAPÊUTICAS E DIAGNÓSTICAS PARA A  
PATOLOGIA E CONTRIBUIÇÕES A PESQUISAS DIRECIONADAS AO  
MAL DE ALZHEIMER**

**Soraia John da Silva**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISFUNÇÃO COGNITIVA CANINA: ESTUDO DE NOVAS  
ABORDAGENS TERAPÊUTICAS E DIAGNÓSTICAS PARA A  
PATOLOGIA E CONTRIBUIÇÕES A PESQUISAS DIRECIONADAS AO  
MAL DE ALZHEIMER**

**SORAIA JOHN DA SILVA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Cristiane Martins Cardoso**

*e Co-orientação do Professor*  
**Arthur Eugen Kümmerle**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora em  
Química**, no Programa de Pós-  
Graduação em Química, Área de  
Concentração em Química.

Seropédica-RJ  
Setembro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586d SILVA, SORAIA JOHN DA, 1990-  
DISFUNÇÃO COGNITIVA CANINA: ESTUDO DE NOVAS  
ABORDAGENS TERAPÊUTICAS E DIAGNÓSTICAS PARA A  
PATOLOGIA E CONTRIBUIÇÕES A PESQUISAS DIRECIONADAS AO  
MAL DE ALZHEIMER / SORAIA JOHN DA SILVA. - RIO DE  
JANEIRO, 2019.  
133 f.: il.

Orientadora: CRISTIANE MARTINS CARDOSO.  
Coorientador: ARTHUR EUGEN KUMMERLE.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, QUÍMICA, 2019.

1. DISFUNÇÃO COGNITIVA. 2. ANTICOLINESTERÁSICOS.  
3. BIOMARCADORES. 4. ACETILCOLINA. 5. ANTIOXIDANTES.  
I. CARDOSO, CRISTIANE MARTINS, 1973-, orient. II.  
KUMMERLE, ARTHUR EUGEN , 1979-, coorient. III  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
QUÍMICA. IV. Título.

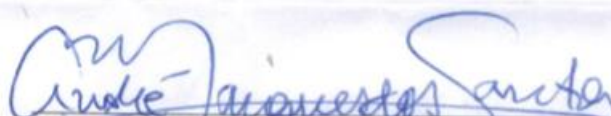
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SORAIA JOHN DA SILVA**

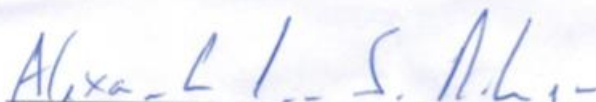
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração Química.

**TESE APROVADA EM: 17/09/2019**

  
Cristiane Martins Cardoso (Dra.) UFRRJ

  
André Marques dos Santos (Dr.) UFRRJ

  
André Luiz Gomes Vieira (Dr.) UFRRJ

  
Alexandre dos Santos Rodrigues (Dr.) UFF

  
Mário Roberto Senger (Dr.) IOC

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jose Claudio e Aira, por terem sido sempre tão amorosos e por terem colocado a educação das filhas entre as maiores prioridades de suas vidas.

Ao meu esposo, Edson, por ser o meu amor, melhor amigo e companheiro de caminhada.

À minha filha Maria, por me fazer conhecer o amor mais puro e incondicional do mundo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço e louvo a Deus por eu ter chegado até aqui e por todos acontecimentos ocorridos durante a minha caminhada.

Agradeço toda minha família – do Rio e de Paracatu – por sempre me apoiarem e por serem fontes de amor, paz e otimismo para mim.

Agradeço ao meu pai, Jose Claudio da Silva, por sempre ter acreditado nos meus estudos e por sempre ter me dado muito amor, carinho e apoio. Agradeço também por estar sempre orando por mim!

Agradeço à minha mãe, Aira John, por todo apoio, por todo amor e por toda sua presença, que foi - e é - tão fundamental. Agradeço por cuidar tanto de mim, do meu marido e das nossas meninas. Agradeço pela disposição em sempre nos ajudar. Agradeço pelas vezes em que ficava esperando do lado de fora do laboratório com minha filha – desde seus 2 meses de vida – no colo, para que Maria pudesse mamar e para que eu pudesse continuar meus experimentos. Agradeço à minha mãe por ser exatamente do jeito que ela é.

Agradeço às minhas irmãs Sarah e Bií por sempre terem sido minhas amigas incentivadoras e por sempre estarem prontas para me ajudar.

Agradeço às meninas da minha vida - Estela, Maria, Helena e Vitória - por serem luz, amor e alegria pra nossa família! Vocês são puro amor e eu amo vocês até o infinito!

Agradeço ao meu anjo, marido e amor, Edson Gomes. Agradeço por ser meu parceiro, meu companheiro, cúmplice e melhor amigo. Obrigada por me compreender tanto, por saber conviver com minhas ansiedades e por me dar tanto amor. Obrigada por me ouvir. Obrigada por sempre me dar suas palavras de otimismo. Obrigada pelo seu ombro amigo e por seu abraço de amor. Obrigada pelos dias e pelas noites de estudo, filmes, séries e diversões juntos. Obrigada pelas nossas conversas acadêmicas, pelas nossas trocas e por sempre me colocar pra cima! Obrigada por estar sempre pronto pra me ajudar, inclusive com a construção desta tese. Enfim, obrigada por viver a vida ao meu lado! “Não sei o quanto o mundo é bom, mas ele ficou melhor desde que você chegou...”

Agradeço à minha pequena grande Maria. Quando fiz a seleção para o Doutorado, ela já estava dentro da minha barriga e viveu comigo todos os momentos desse doutoramento: a ansiedade, as alegrias, as tristezas, os desapontamentos, as angústias e as vitórias. Me acompanhou nos dias e nas noites de estudo. Estudava comigo, me abraçava quando me via

chateada e se alegrava com cada alegria que eu vivia. Me acompanhou em aulas, seminários, reuniões e me esperava fazer os experimentos junto com a vovó ou o papai. Sempre tão linda, tão doce e tão cheia de amor, alegria e vida. Obrigada, Maria, por tornar tudo mais leve e feliz, sempre! Obrigada, Maria, por me fazer mãe! Você é a melhor parte da vida!

Agradeço à minha orientadora, Cristiane Cardoso, pelos ensinamentos, pelas ajudas, pela amizade e por essa parceria de dez anos!

Agradeço a todos os professores da UFRRJ que foram tão importantes nesta trajetória, em especial à minha orientadora, ao meu co-orientador – prof. Arthur Kummerle – e à professora Magda Medeiros.

Agradeço a todos os professores e alunos da UFRRJ que colaboraram concretamente com este projeto, em especial aos membros do Laboratório de Bioquímica do IZ, do setor de Anatomia Patológica, do Ambulatório de Acupuntura, do Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal, e do Laboratório de Química de Produtos Naturais. Agradecimento especial ao professor Cristiano Riger e à aluna Andreia Moraes do Laboratório de Estresse Oxidativo em Microorganismos pela colaboração nos experimentos com leveduras. Agradecimento especial também ao professor Carlos Maurício Sant’Anna e à pesquisadora Catarina de Nigris do Laboratório de Modelagem Molecular pela colaboração nos estudos computacionais.

Agradeço a todos os amigos que me auxiliaram com as coletas de sangue e entrevistas, aos que me acompanharam no laboratório e aos que me ajudaram de diversas formas na construção desta tese. Em especial: Manoela Tuppan, Ciro Oliveira, William Almeida, Gabriel Gonzaga, Iury Uzêda, Taís Rosa, Marcela Alves, Daniele Rodrigues, Renata Gomes e Sarah John.

Agradeço a todos os animais e seus respectivos tutores que participaram deste trabalho. E agradeço também aos meus eternos irmãos de quatro patas: Zé, Diana, Chico e Rebecca!

Agradeço a todos os membros da Banca Examinadora por terem aceitado o convite para participação na Defesa desta Tese e por suas contribuições.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), aos quais também agradeço.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

DA SILVA, Soraia John. **Disfunção Cognitiva Canina: estudo de novas abordagens terapêuticas e diagnósticas para a patologia e contribuições a pesquisas direcionadas ao Mal de Alzheimer.** 2019. 121p Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A Disfunção Cognitiva Canina (DCC) é uma alteração neurodegenerativa que afeta cães idosos e que apresenta bastante semelhança com a Doença de Alzheimer (DA) em humanos. Ambas as patologias são consideradas multifatoriais e apresentam evidência de depósito de  $\beta$ -amilóide; dano oxidativo; hiperfosforilação da proteína Tau; desequilíbrio nos níveis de neurotransmissores, como acetilcolina (ACh); entre outros fatores. Uma vez que a ACh desempenha papel fundamental em processos cognitivos, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da DCC sobre enzimas que degradam ACh, também conhecidas como colinesterases, e sobre duas enzimas do sistema antioxidante: catalase e glutathione S-transferase. Para isso foram avaliadas amostras de sangue de 48 cães divididos em 5 grupos: controle, grupo de risco, DCC leve, DCC moderada, DCC avançada. Esta parte do trabalho compõe o capítulo 1 da presente tese. Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre as atividades destas enzimas nos cinco grupos estudados, foi possível observar alteração nas atividades médias das colinesterases (utilizando acetilcolina como substrato), catalase e GST. Estas diferenças mostram que, apesar de tais enzimas não se mostrarem apropriadas como biomarcadores da DCC, elas podem futuramente vir a ser usadas como adjuvantes na análise da evolução da doença e na avaliação da resposta ao tratamento utilizado. Uma vez que muitos tratamentos da DA são baseados no uso de inibidores de acetilcolinesterase (AChE), este trabalho também teve como objetivo avaliar a eficácia de infusões, fitoquímicos e de compostos sintéticos na inibição *in vitro* desta enzima em cérebro de cães. Esta segunda parte do trabalho compõe o capítulo 2 desta tese. A infusão de *Peumus boldus* apresentou destaque neste estudo mostrando-se eficaz na inibição desta enzima e com potencial antioxidante significativo. O fitoquímico quercetina e os compostos sintéticos Cum3 e Cum4 se destacaram como inibidores competitivos da atividade de AChE. Também foi avaliado o efeito destes compostos, bem como da infusão de boldo, sobre a atividade sérica de butirilcolinesterase (BChE) em cães. Entretanto, todos os tratamentos foram mais eficazes na inibição da atividade de AChE cerebral do que da atividade de BChE em soro. Os resultados obtidos neste trabalho, embora ainda iniciais, são promissores e podem contribuir para um avanço nos estudos de novas formas de diagnóstico e tratamento da DCC.

Palavras-chave: anticolinesterásicos; biomarcadores; disfunção cognitiva.



## ABSTRACT

DA SILVA, Soraia John. **Canine Cognitive Dysfunction: study of new therapeutical and diagnostic approaches for the pathology and contributions to research directed to Alzheimer's Disease.** 2019. 121p Thesis (Chemistry doctorate). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Canine Cognitive Dysfunction (CCD) is a neurodegenerative disorder that affects older dogs and it is very similar to Alzheimer's Disease (AD) in humans. Both pathologies are considered multifactorial and present evidence of b-amyloid deposition; oxidative stress; hyperphosphorylation of Tau protein; imbalance in neurotransmitter levels, such as acetylcholine (ACh) among other factors. Since ACh plays a key role in cognitive processes, this work aimed to evaluate the effect of DCC on enzymes that degrade Ach, also known as cholinesterases, and two enzymes of the antioxidant system: catalase and glutathione S-transferase. Thus, blood samples from 48 dogs divided into 5 groups were evaluated: control, risk group, mild DCC, moderate DCC, severe DCC. This aforementioned part of the paper composes chapter 1 of this thesis. Although there was no significant difference between the activities of these enzymes in the five groups studied, it was possible to observe changes in the average activities of cholinesterases (using acetylthiocholine as substrate), catalase and GST. These differences show that although such enzymes are not shown to be suitable as CCD biomarkers, they may in future be used as adjuvants in the analysis of disease evolution and in the assessment of response to treatment used. Since many AD treatments are based on the use of acetylcholinesterase inhibitors (AChE), this work also aimed to evaluate the efficacy of infusions, phytochemicals and synthetic compounds in the *in vitro* inhibition of this enzyme in dog's brain. This second part of the paper composes chapter 2 of this thesis. The infusion of *Peumus boldus* presented prominence in this study proving effective in the inhibition of this enzyme and with significant antioxidant potential. The phytochemical quercetin and synthetic compounds Cum3 and Cum4 have stood out as competitive inhibitors of AChE activity. The effect of these compounds, as well as of boldo infusion, on the serum activity of butyrylcholinesterase (BChE) in dogs was also evaluated. However, all treatments were more effective in inhibiting brain AChE activity than BChE activity in serum. Although the outcomes of this study are still initial, they are promising ones and can contribute to an advance in the studies of new forms of diagnosis and treatment of CCD.

**Key words:** anticholinesterases; biomarkers; cognitive dysfunction.

## LISTA DE ABREVIACOES

ABRAz	Associação Brasileira de Alzheimer;
ACh	Acetilcolina;
AChE	Acetilcolinesterase;
APP	Proteína Precursora de Amilóide;
A $\beta$	$\beta$ -amilóide;
A $\beta$ Os	Oligômeros $\beta$ -amilóide;
BCh	Butirilcolina;
BChE	Butirilcolinesterase;
DA	Doença de Alzheimer;
DBS	Deep Brain Stimulation;
DCC	Disfunção Cognitiva Canina;
EROS	Espécies reativas de oxigênio;
GSSG	Glutaciona oxidada
GPx	Glutaciona peroxidase;
GR	Glutaciona redutase;
GSH	Glutaciona reduzida;
GST	Glutaciona S-transferase;
NMDA	N-Metil-D-Aspartato;
PAS	Sítio Aniônico Periférico;
RNC	Redes Neurais Convolucionais.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1 Caracterização da Disfunção Cognitiva Canina e seus aspectos clínicos.....	3
2 Alterações bioquímicas e hipóteses etiológicas da Doença de Alzheimer .....	4
3 Sistema de neurotransmissão colinérgica .....	9
4 Antioxidantes .....	15
4.1 Catalase .....	16
4.2 Glutathione S-transferase .....	18
CAPÍTULO I.....	21
ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE ENZIMAS SANGUÍNEAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES ESTÁGIOS DA DCC.....	21
RESUMO .....	22
ABSTRACT .....	23
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Aprovação pelo Comitê de Ética .....	27
2.2 Coleta de sangue de cães e definição de grupos .....	27
2.3 Ensaio enzimáticos .....	28
2.3.1 Preparo de soro para ensaio das colinesterases e de GST.....	28
2.3.2 Determinação da atividade de colinesterases .....	28
2.3.3 Determinação da atividade de glutathione S-transferase .....	29
2.3.4 Preparo de sangue total para ensaio de catalase .....	29
2.3.5 Determinação da atividade de catalase .....	29
2.4 Análise estatística .....	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31

3.1 Separação dos grupos e escores obtidos nos questionários .....	31
3.2 Atividades enzimáticas .....	34
3.2.1 Colinesterases.....	35
3.2.2 Catalase .....	39
3.2.3 Glutathiona S-transferase .....	43
4 CONCLUSÃO.....	47
CAPÍTULO II.....	48
ESTUDO DE NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA A DCC.....	48
RESUMO .....	49
ABSTRACT .....	50
1 INTRODUÇÃO.....	51
1.1 Tratamento de animais com Disfunção Cognitiva Canina .....	51
1.2 Uso de anticolinesterásicos na Doença de Alzheimer.....	52
1.3 Uso de outras alternativas de tratamento na Doença de Alzheimer.....	55
1.4 Busca de novos adjuvantes para o tratamento da DCC e da DA.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1 Obtenção e preparo dos compostos sintéticos e naturais.....	61
2.2 Ensaio de acetilcolinesterase.....	61
2.2.1 Obtenção de amostras de cérebros de cães.....	61
2.2.2 Homogeneização de cérebros de cães .....	62
2.2.3 Dosagem de proteína no homogeneizado cerebral.....	62
2.2.4 Determinação da atividade de acetilcolinesterase .....	62
2.2.5 Determinação de parâmetros cinéticos.....	63
2.3 Ensaio de butirilcolinesterase .....	63
2.3.1 Obtenção de amostras de sangue.....	63
2.3.2 Preparo de soro sanguíneo.....	63
2.3.3 Determinação da atividade de butirilcolinesterase.....	64
2.4 Ensaio em levedura .....	64
2.5 Análise estatística.....	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66

3.1 Atividade de acetilcolinesterase <i>versus</i> concentração proteica .....	66
3.2 Efeito de compostos naturais sobre acetilcolinesterase cerebral .....	66
3.2.1 Infusões .....	66
3.2.2 Fitoquímicos isolados.....	69
3.3 Efeito de compostos sintéticos sobre acetilcolinesterase cerebral.....	71
3.3.1 Série das tacrinas.....	73
3.3.2 Série I das cumarinas.....	74
3.3.3 Série das harmanas .....	78
3.4 Ensaio realizado com os compostos que apresentaram maior eficácia .....	80
3.4.1 Efeito de compostos sobre butirilcolinesterase sérica.....	80
3.4.2 Estudo cinético da atividade de acetilcolinesterase.....	83
3.4.3 Ensaio de toxicidade em leveduras .....	87
4 CONCLUSÃO.....	89
CONCLUSÕES GERAIS .....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91
ANEXOS .....	109
Anexo A.....	110
Anexo B .....	112
Anexo C .....	113
Anexo D.....	114
Anexo E .....	115
Anexo F.....	117
Anexo G.....	118
Anexo H.....	119
Anexo I .....	121



## INTRODUÇÃO GERAL

O aumento na expectativa de vida dos cães tem ocasionado elevação no índice de doenças neurodegenerativas nestes animais, entre estas a Disfunção Cognitiva Canina (DCC). A DCC é uma patologia semelhante à Doença de Alzheimer (DA) em humanos, sendo caracterizada principalmente por um declínio progressivo na função cognitiva do animal e sendo considerada uma patologia multifatorial devido à diversidade de fatores envolvidos na sua fisiopatogenia. Entre estes fatores pode-se destacar o acúmulo de peptídeos  $\beta$ -amilóides, desequilíbrio de neurotransmissores e aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KATINA et al., 2016; TRAVANCINHA, 2014). Tanto na DA quanto na DCC há um desequilíbrio no sistema de neurotransmissão colinérgico (ARAUJO, 2011; VENTURA, 2010). O desequilíbrio deste sistema parece estar relacionada ao déficit cognitivo, uma vez que a acetilcolina exerce papel fundamental na ativação das áreas de memória e aprendizagem.

O acúmulo de EROs na DCC e na DA parece estar relacionado ao acúmulo do peptídeo  $A\beta$  e desempenha um papel significativo na condução da patogênese celular. Estas espécies reativas também estão associadas a lesões celulares como a peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas. As células possuem um sistema de defesa antioxidante oferecido por enzimas – como a catalase - e por compostos não enzimáticos como a glutathione reduzida (GSH). Estudos anteriores, portanto, têm demonstrado alteração em integrantes deste sistema de defesa em pacientes com DA (SOFIC et al., 2015; GIORDANO et al., 2014).

Devido a estas alterações principalmente na neurotransmissão colinérgica e no estresse oxidativo, este trabalho teve como primeiro objetivo a avaliação do efeito da DCC sobre enzimas sanguíneas relacionadas ao sistema antioxidante e sobre enzimas que hidrolisam a acetilcolina (acetilcolinesterase e butirilcolinesterase). As enzimas relacionadas ao sistema antioxidante estudadas foram: catalase e glutathione S-transferase (GST). A catalase é responsável pela hidrólise de peróxido de hidrogênio, enquanto a GST está relacionada ao nível de GSH, uma vez que utiliza este composto como co-substrato. E, em geral, há uma correlação entre uma depleção nos níveis de glutathione e a Doença de Alzheimer (MAZZETTI et al., 2015). Desta forma, esta parte do trabalho – Capítulo I - pretendeu auxiliar na busca de novos biomarcadores para a DCC.

Tanto para a DA quanto para a DCC não há um tratamento que estabeleça a cura destas doenças. O tratamento atual visa principalmente estabilizar o comprometimento

cognitivo e retardar o progresso da patologia. E, em ambas as doenças, pode haver grande dificuldade no estabelecimento do diagnóstico (CAETANO, 2017; PANTOJA, 2010).

Devido às semelhanças entre tais patologias, os cães são vistos como um bom modelo de estudo para a DA. Além disso, devido à escassez dos estudos sobre a DCC, os trabalhos sobre a DA podem ser utilizados como literatura complementar para pesquisas voltadas à Disfunção Cognitiva Canina.

Muitas terapias para DA se baseiam na inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise da ACh, visando assim aumentar a disponibilidade deste neurotransmissor. Embora os anticolinesterásicos ainda não sejam muito utilizados no tratamento da DCC, trabalhos anteriores mostraram que compostos que aumentam o nível de ACh em cães podem provocar melhorias na memória e na aprendizagem destes animais (ARAUJO et al., 2011; LANDSBERG, 2005). Desta forma, o presente trabalho teve como segundo objetivo, o estudo da inibição *in vitro* desta enzima através de compostos naturais e sintéticos em cérebros de cães. Esta parte da pesquisa é apresentada no capítulo II desta tese e as análises descritas pretendem auxiliar na busca de formas mais eficazes no tratamento da DCC e que sejam mais seguras para os animais. E, uma vez que a DCC possui grande semelhança à DA, este trabalho também pretende contribuir para os estudos da Doença de Alzheimer.



## REVISÃO DE LITERATURA

### 1 Caracterização da Disfunção Cognitiva Canina e seus aspectos clínicos

Os avanços da Medicina Veterinária somados a fatores como o maior cuidado por parte dos proprietários dos animais de companhia, possibilitaram um aumento na expectativa de vida destes animais (NEILSON et al., 2001). Juntamente com o aumento desta taxa, ocorre uma elevação na incidência de doenças degenerativas (DE ALMEIDA et al., 2006).

A Disfunção Cognitiva Canina é uma alteração neurodegenerativa que afeta cães geriátricos, sendo caracterizada por um declínio progressivo na função cognitiva do animal, o que resulta em deficiência de aprendizagem, memória, percepção espacial e alterações nos padrões de sono e interação social (TRAVANCINHA, 2014; LANDSBERG e MALAMED, 2017). Segundo Seoane (2012), cães de raças grandes e gigantes podem ser considerados geriátricos a partir de 5 anos de idade, enquanto os de raças pequenas ou médias são estimados como de meia idade a partir dos 7 anos. Braz e colaboradores (2017), entretanto, consideram apenas cães acima de 8 anos de idade como animais idosos.

Os sinais clínicos da DCC podem ser divididos em cinco categorias de comportamento e o acrônimo DISHA apresenta estes sinais: *disorientation* (desorientação), *interaction changes* (mudança na interação), *sleep/wake disturbances* (distúrbios no ciclo sono/vigília), *house soiling* (sujar a casa; relacionado ao fato do animal defecar e urinar em casa) e *activity changes* (mudança no nível de atividade). Alguns pesquisadores consideram a adição de mais um “a” no acrônimo, ficando assim como DISHAA. O último “a” refere-se à ansiedade aumentada em animais com DCC (LANDSBERG et al., 2003).

Um animal com dificuldade em entrar e/ou sair de casa é um exemplo do fator desorientação; alteração na interação se refere a modificações no padrão de interação do animal, como deixar de cumprimentar seu tutor quando este retorna ao lar; alterações no ciclo sono/vigília podem ser exemplificadas como o animal que desperta com frequência à noite ou dorme de forma exagerada durante o dia; um animal que passa a defecar e urinar em casa, mudando um comportamento anterior de enviar sinais que precisava ir à rua, está apresentando a categoria “house soiling”; e a alteração no nível de atividade pode ser demonstrada, entre outras formas, em uma indisposição do animal em interagir com as pessoas ou menor interesse em se alimentar (HORWITZ e NEILSON, 2008).

Segundo os estudos de Katina e colaboradores (2016), não há influência significativa do sexo, status reprodutivo, peso do animal, bem como do tipo de moradia, para a progressão da doença. Estes autores, entretanto, observaram pela primeira vez que a nutrição pode representar um fator para o desenvolvimento da DCC. Animais submetidos à dieta descontrolada, como ração comercial de baixa qualidade, apresentaram risco maior para desenvolvimento da DCC que os animais submetidos à dieta controlada, como ração comercial de alta qualidade.

A Doença de Alzheimer, encontrada com frequência em humanos idosos, é a forma mais comum de demência no ser humano. A DCC é uma patologia que possui fisiopatologia bastante semelhante à DA (ADAMS et al., 2000; BOWEN e HEATH, 2005), também sendo caracterizada como distúrbio multifatorial (KATINA et al., 2016). Assim, em função da idade, cães desenvolvem déficits cognitivos e neuropatologia semelhantes aos vistos no envelhecimento e demência humana (COTMAN et al., 2002; STUDZINSKI et al., 2005).

Em 1990 já havia sido descrito sobre a possibilidade do uso de cães como modelo para o estudo da DA e ainda hoje a DCC é apontada como um bom modelo para estabelecer novas estratégias para a DA (WISNIEWSKI et al., 1990; GANDY et al., 2017). Para Head e colaboradores (2002), a evidência de dano oxidativo generalizado e deposição de A $\beta$  é uma justificativa adicional para o uso do modelo canino para estudar o envelhecimento do cérebro humano e doenças neurodegenerativas.

Segundo Bosch e colaboradores (2012), as semelhanças existentes entre essas duas patologias podem auxiliar a eficácia do uso de cães como modelo para estudos referentes à Doença de Alzheimer. Araujo e colaboradores (2011) também destacaram o cão como um bom modelo para o estudo de tratamentos voltados para a DA. Além disso, as semelhanças entre estas duas patologias também favorecem o uso de dados da literatura da Doença de Alzheimer para o estudo da DCC, uma vez que a literatura desta patologia canina ainda é escassa.

## **2 Alterações bioquímicas e hipóteses etiológicas da Doença de Alzheimer**

A Doença de Alzheimer pode ser classificada como familiar (de origem hereditária) ou como esporádica, sendo esta última a mais comum (OCAMPO et al., 2015). A DA do tipo familiar ocorre por volta dos 40 anos, sendo também chamada de precoce. A DA do tipo esporádica ocorre ao redor de 60 anos, sendo também denominada de tardia (SMITH, 1999).

Muitas hipóteses vêm sendo levantadas ao longo do tempo para explicar a patogenia desta doença.

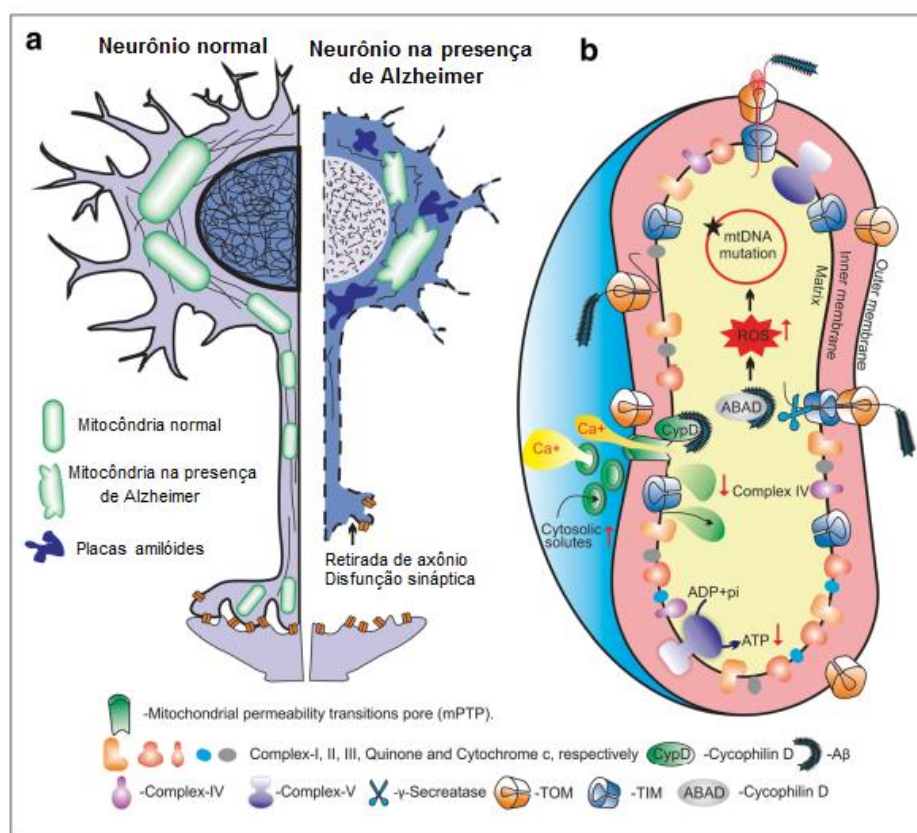
Como destacado por Francis et al. (1999), a proposta sobre a contribuição da degeneração de neurônios colinérgicos e da perda da neurotransmissão colinérgica para a deterioração da função cognitiva na DA, faz parte da chamada “hipótese colinérgica da Doença de Alzheimer”, estudada por autores como Bartus e colaboradores (1982). Na metade da década de 80 também foi estudada a chamada “hipótese glutamatérgica”. E, segundo Greenamyre et al. (1988), a toxicidade do glutamato poderia desempenhar um papel na patogênese da doença de Alzheimer. Em meados dos anos 90 é proposta a hipótese da cascata amiloide por Hardy e Higgins (1992). Segundo estes autores, a deposição de  $\beta$ -amiloide seria o agente causador da DA.

Alguns estudos também mostraram correlação entre íons metálicos e DA, bem como entre diabetes e DA (FALCO et al., 2016). Outras pesquisas vêm apresentando correlações da Doença de Alzheimer com outras condições, como determinadas infecções por bactérias e vírus (ASHRAF et al., 2019) e exposição a pesticidas (YAN et al., 2016). Segundo Wiseman e colaboradores (2015), a Síndrome de Down está associada a um risco muito maior do desenvolvimento da DA do tipo precoce. Segundo Krstic e Knuesel (2013), as condições inflamatórias crônicas podem representar um importante desencadeador da DA tardia por induzirem alterações no citoesqueleto (relacionadas à proteína tau) e comprometimento do transporte axonal. Os processos inflamatórios poderiam ser, segundo eles, o principal estressor celular após os 80 anos ou mais.

Estas correlações e hipóteses serão comentadas ao longo deste texto, mas atualmente a Doença de Alzheimer é considerada uma patologia multifatorial, assim como a DCC. Desta forma, considera-se que na DA haja presença de placas extracelulares compostas por  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A); emaranhados neurofibrilares intracelulares contendo proteína tau fosforilada; perda de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal que inervam regiões como hipocampo e córtex; entre outras alterações (ZHENG et al., 2002). A Doença de Alzheimer pode ser também considerada um transtorno neuroendócrino, onde tem sido nomeada de Diabetes tipo 3. Este termo se justifica por fatores como um metabolismo energético deficiente e menor expressão de genes codificadores da insulina (STEEN et al., 2005).

Tanto em humanos com DA quanto em cães com DCC, à medida que o metabolismo mitocondrial torna-se deficiente e ocorrem déficits bioenergéticos, há maior produção de radicais livres e aumento da produção de peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), que também

possui ação tóxica e que também prejudica ainda mais as mitocôndrias (CADONIC et al., 2016; HEAD, 2013; BOWEN e HEATH, 2005;). A Figura 1A apresenta algumas alterações no metabolismo mitocondrial ocorridas na presença da DA e a Figura 1B apresenta a proposta de importação de A $\beta$  para a mitocôndria por meio de translocases de membrana externa (TOM – Translocase of the Outer Membrane) e de membrana interna (TIM - Translocase of the Inner Membrane) feita por Cadonic e colaboradores (2016).



**Figura 1:** A) Morfologia alterada das mitocôndrias e do espaço sináptico e redução do nível de transporte axonal mitocondrial na presença da Doença de Alzheimer. B) Mitocôndria no estado de doença: translocação de A $\beta$  para a mitocôndria através dos complexos TOM e TIM. A $\beta$  na mitocôndria influenciando complexo IV da Cadeia Transportadora de Elétrons, efluxo de cálcio e causando mutação do mtDNA (DNA mitocondrial). (Modificado de Cadonic e colaboradores, 2016).

Serrão e colaboradores (2011) também destacaram em seu trabalho que distúrbios bioquímicos decorrentes da formação das placas senis pelos agregados de peptídeo A $\beta$  provocam estresse oxidativo, inflamação, citotoxicidade e apoptose, culminando em neurodegeneração.

Anteriormente, muitos estudos relacionavam depósitos insolúveis de placas  $\beta$ -amilóides com o Alzheimer. Mais recentemente tem sido mostrado que oligômeros solúveis são

a principal causa de disfunção sináptica e neurodegeneração. Segundo Meneghetti (2014), o peptídeo  $\beta$ -amilóide parece não exercer efeito tóxico quando em forma monomérica. A polimerização destes monômeros forma oligômeros e posteriormente protofibrilas e fibrilas que possuem efeito neurotóxico. Os oligômeros deste peptídeo se ligam a terminais sinápticos, desencadeando a falência sináptica (DECKER, 2010).

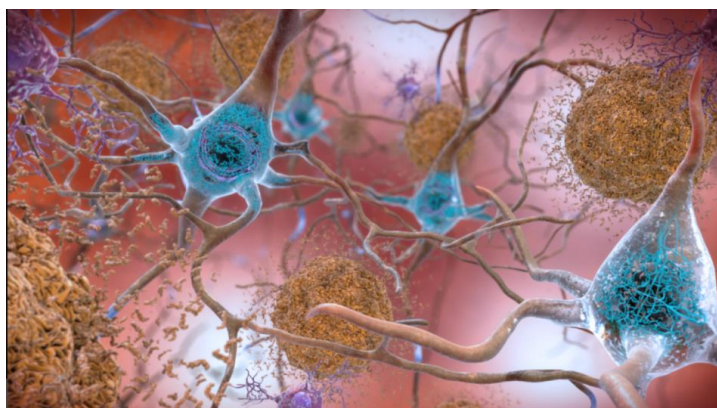
Estes oligômeros são capazes de interagir com diversas proteínas como, por exemplo, receptores glutamatérgicos do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA), localizados nas membranas neuronais. Uma vez que estes receptores estão envolvidos com processos como aprendizagem e memória, tem sido mostrado que os mesmos podem desempenhar papel significativo na execução da disfunção sináptica e da morte neuronal desencadeada por  $A\beta$ . A DA está ainda associada ao aumento da perda dos neurônios glutaminérgicos. A disfunção destes neurônios aumenta a frequência da despolarização da membrana pós-sináptica e reduz a detecção dos sinais fisiológicos mediados pelo receptor de NMDA. Vale ressaltar que a excessiva ativação destes receptores promove alteração da homeostase de cálcio e tal alteração é importante para iniciação do processo de apoptose dos neurônios (DANYSZ e PARSONS, 2012; PEREIRA e SANTOS, 2014; FALO et al., 2016, BRASIL, 2017).

Diversos estudos têm mostrado também que íons metálicos endógenos, como cobre (II) e ferro (III), podem contribuir para a agregação de  $A\beta$ , aumentando a estabilidade deste depósito e a sua toxicidade, contribuindo também para aumento do estresse oxidativo a nível cerebral (HANE et al., 2013; FALCO et al., 2016). Além de metais fisiológicos, também tem sido apresentado o impacto de metais tóxicos - como o chumbo - na amiloidogênese. O chumbo se mostrou, por exemplo, capaz de aumentar a expressão da proteína precursora de amiloide (APP) (BASHA et al., 2005). A formação de  $A\beta$  a partir do APP ocorre através da ação de enzimas secretases ( $\beta$  e  $\gamma$ ). Expressa de forma constitutiva, a função fisiológica de APP ainda não foi completamente elucidada (KREUTZ, 2010). Vale ressaltar que APP pode ser usada também como substrato por  $\alpha$ -secretases e, neste caso, não levará à formação de peptídeo  $A\beta$  (ZINSER et al. 2007).

A hiperfosforilação da proteína Tau também tem destaque na patogenia da Doença de Alzheimer. Como afirmam Busche e colaboradores (2019), a coexistência de  $A\beta$  com emaranhados neurofibrilares de Tau está ligada às falhas do Sistema Nervoso e ao declínio cognitivo da DA.

Travancinha (2014) em seus estudos sobre DCC destaca que existem evidências de que a progressão da Disfunção Cognitiva também esteja associada a aumento da

hiperfosforilação da proteína Tau. A proteína Tau é componente essencial dos microtúbulos, onde se encontra em estado polimerizado. A estabilidade do polímero depende do grau de fosforilação da Tau, tornando-se mais instável quanto mais fosforilada estiver a proteína. Conseqüentemente, a hiperfosforilação da Tau relaciona-se com menor estabilidade do citoesqueleto, favorecendo a morte neuronal. Evidências indicam que o acúmulo de  $\beta$ A podem iniciar a fosforilação de Tau (FORLENZA e GATTAZ, 1998; ZHENG et al., 2002). Nas placas formadas no cérebro de cães e humanos com estas patologias observa-se substância  $A\beta$  e proteína Tau, contudo, as organizações e distribuições destas substâncias diferem entre as espécies (TRAVANCINHA, 2014). Um modelo desta distribuição na DA é mostrado na Figura 2.



**Figura 2:** Placas  $\beta$ -amilóides e Tau no cérebro. Placas  $\beta$ -amilóide (marrom) se acumulam entre neurônios no cérebro com Alzheimer. Emaranhados de proteína tau (azul) dentro dos neurônios. Fonte: <https://www.flickr.com/photos/nihgov/38686503251/in/photostream/> - National Institute on Aging.

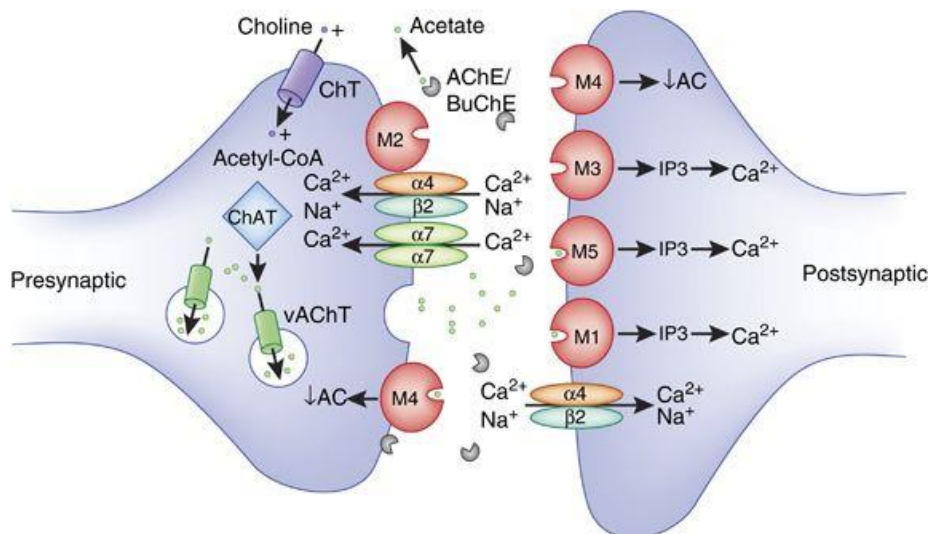
O acúmulo de peptídeo  $A\beta$  gera diversos danos aos neurônios, mas também é bastante prejudicial aos astrócitos. Segundo Diniz e colaboradores (2017), os oligômeros  $A\beta$  ( $A\beta$ Os) interagem com os astrócitos, ativam estas células e desencadeiam a geração anormal de espécies reativas de oxigênio acompanhada de comprometimento do potencial de neuroproteção destas células *in vitro*. Os astrócitos controlam o balanço entre sinais excitatórios e inibitórios e para desempenho desta função tem-se a liberação do fator transformador de crescimento beta-1 (TGF- $\beta$ 1) (DINIZ et al., 2014). Diniz e colaboradores (2017) sugerem que TGF- $\beta$ 1 seja parte de um mecanismo endógeno que protege as sinapses contra os  $A\beta$ Os.

Alterações histopatológicas; danos no DNA; alterações vasculares, neuronais e gliais; redução no número de neurônios; aumento do volume ventricular cerebral; depósitos

neurotóxicos, incluindo lipofuscina e ubiquitina; calcificação das meninges; bem como uma resposta inflamatória em torno das placas A $\beta$  também são observadas em cães com DCC (BORRÀS et al., 1999; HORWITZ e NEILSON, 2008; VASCONCELLOS et al., 2013). Tanto na DCC quanto na DA também ocorre diminuição ou desequilíbrio nos níveis de neurotransmissores como acetilcolina, serotonina, norepinefrina e dopamina. O declínio na acetilcolina, por exemplo, está relacionado ao comprometimento cognitivo, uma vez que a mesma tem uma função estimulante do SNC e um papel fundamental na ativação das áreas de memória e aprendizagem (DEWEY e COSTA, 2015; RUEHL e HART, 1998; HEIBLUM et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2013; FOIDL et al., 2016)

### **3 Sistema de neurotransmissão colinérgica**

A acetilcolina, mediador químico de sinapses, é sintetizada pela enzima colina-o-acetil-transferase a partir de acetil-coenzima A e colina. As fontes de colina para a síntese de ACh provém da circulação, além da sua recaptação após a liberação e degradação desse neurotransmissor. Após sua síntese, a ACh pode ser transportada e armazenada em vesículas sinápticas. A ACh pode se ligar a receptores nicotínicos ou muscarínicos e sua hidrólise é realizada por enzimas colinesterases (JONES et al., 2012; VENTURA et al., 2010). A representação de uma hipotética sinapse colinérgica é apresentada na Figura 3.



**Figura 3:** Representação de uma hipotética sinapse colinérgica com receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4 e M5) - que fornecem respostas sinápticas mais lentas - e nicotínicos ( $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$ ) - que medeiam a transmissão sináptica rápida. A acetilcolina (ACh) é sintetizada nos neurônios colinérgicos pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) através da transferência de acetil-CoA para colina. Colina é captada por transportadores de colina de alta afinidade (ChT). ACh é empacotada em vesículas sinápticas pelo transportador de acetilcolina vesicular (vAChT) e após ativação neuronal pode se ligar a receptores ou ser inativada por colinesterases (AChE ou BuChE). Neste último caso, a colina gerada será transportada através dos transportadores ChTs, onde pode novamente ser utilizada para síntese de acetilcolina (JONES et al., 2012).

Os receptores nicotínicos medeiam uma transmissão excitatória rápida. Esses receptores são constituídos por cinco subunidades proteicas e estão distribuídos em vários tecidos, incluindo o cérebro e o tecido muscular. Além disso, envolvem-se com aspectos importantes da função cognitiva, incluindo atenção, aprendizagem e memória. Os receptores muscarínicos também estão envolvidos no controle destas funções cognitivas e relacionam-se também com respostas emocionais, na modulação do estresse, no sono e na vigília. Ademais, são importantes na redução da frequência e força da contração cardíaca, relaxamento de vasos sanguíneos periféricos e constrição das vias respiratórias (VENTURA et al., 2010; LEVIN e SIMON, 1998).

Redução tanto na quantidade de receptores colinérgicos quanto na sinalização induzida por esses receptores tem sido observada em regiões específicas no cérebro de pacientes com DA. Isso tem mostrado influência sobre memória, aprendizado, atenção e outros processos cognitivos (SULTZER et al., 2017; VENTURA et al., 2010; SHIMOHAMA et al., 1986). Araujo e colaboradores (2011) também apontam que há evidências de hipofunção colinérgica em pacientes com DDC.

Segundo Giacobini (2003), estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado interação entre a ativação colinérgica e o metabolismo da proteína precursora de amilóide. A redução na



neurotransmissão colinérgica leva ao metabolismo amiloidogênico e contribui para a neuropatologia, segundo Giacobini (2003).

No sistema nervoso central (SNC) existem dois tipos de colinesterases, enzimas que hidrolisam a acetilcolina: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). A AChE é codificada por um gene no cromossomo 7 (7q22), enquanto a BChE é codificada por gene no cromossomo 3 (3q26.1-3q26.2) (MESULAM et al., 2002).

As colinesterases emergiram de uma família de enzimas e proteínas ausente em plantas e presente em animais multicelulares. Em vertebrados, a duplicação que levou à AChE e BChE é considerada um evento antigo, anterior à divisão dos osteíctes (PEZZEMENTI e CHATONNET, 2010).

Estas enzimas possuem um sulco ativo de 20 Å de profundidade e 4 Å de largura, onde a acetilcolina entra. No cérebro de uma pessoa saudável, AChE é responsável por 80% da atividade colinesterásica, enquanto BChE fica com 20%. Com o avanço da DA, a atividade de AChE pode ter um decréscimo de 55%, ao passo que a atividade de BChE pode ter um significativo aumento. A taxa dessas enzimas pode ter um papel importante na progressão da doença (BONO, 2014; MIKICIUK-OLASIK et al., 2007).

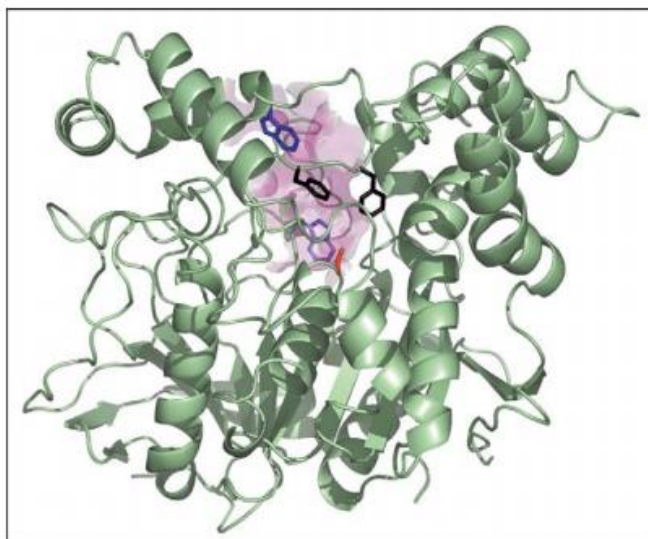
A AChE hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, como a acetilcolina. A BChE pode hidrolizar outras partículas, incluindo peptídeos neuroativos. O substrato butirilcolina, embora seja um substrato facilmente hidrolisado pela BChE, não é um substrato fisiológico em cérebros de mamíferos (BONO, 2014; MIKICIUK-OLASIK et al., 2007; GIACOBINI, 2001).

A AChE é encontrada em locais como o cérebro, junção neuromuscular, eritrócitos e linfócitos. Por outro lado, a BChE é encontrada no plasma, rins, fígado, intestino, pulmão e cérebro. No plasma ou mesmo no soro também há uma baixa atividade de AChE. Entretanto, como a atividade de BChE é mais alta neste local, há grande dificuldade em se fazer a dosagem da atividade de AChE nestes líquidos biológicos (YAMAMOTO et al., 1990; GIACOBINI, 2001; COSTA, 2014). Devido à alta concentração de BChE no plasma, acredita-se que esta enzima tenha função protetora a partir da hidrólise de agentes tóxicos ou na eliminação de acetilcolina do sangue (QUEZADA, 2013).

A AChE e a BChE se apresentam em duas formas moleculares: globular (G1, G2 e G4) e assimétrica (A4, A8 e A12). A forma globular se apresenta como monômero (G1), dímero (G2) ou tetrâmero (G4) de subunidades catalíticas em uma montagem homomérica. Estas podem ser solúveis ou ancoradas à membrana por sequências de aminoácidos hidrofóbicos. A

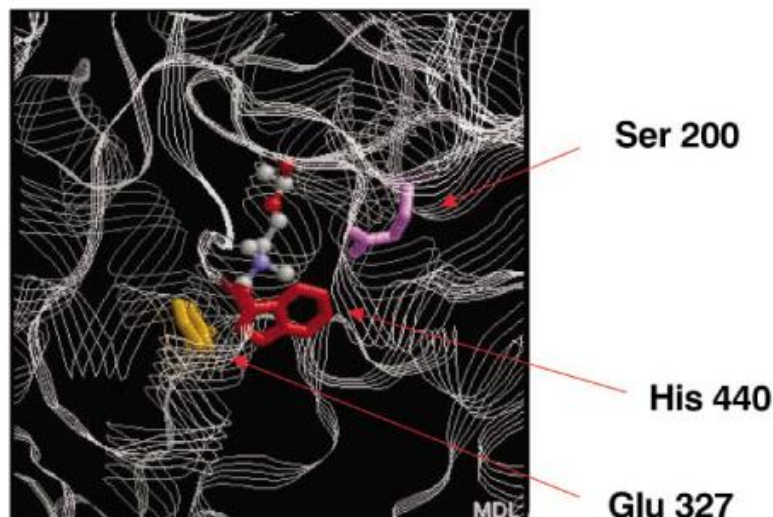
forma G4 é a mais predominante no SNC e a forma G1 apresenta-se em menor quantidade no cérebro. A forma assimétrica, por sua vez, apresenta-se em uma montagem heteromérica das subunidades estrutural e catalítica, onde tetrâmeros catalíticos estão ligados através de pontes dissulfeto e uma subunidade estrutural colagênica. O A4 possui 1 tetrâmero, o A8 possui 2 e o A12 possui 3 tetrâmeros (NORDBERG et al., 2013; COSTA, 2014).

O sítio ativo de AChE apresenta-se como uma cavidade (Figura 4) contendo diferentes subsítios: um esterásico, um subsítio aniônico, um subsítio aniônico periférico (PAS), além de uma cavidade oxiânion e uma bolsa acil. O subsítio aniônico tem como funções a atração e o posicionamento do substrato, enquanto o subsítio esterásico é responsável pela quebra da ligação éster.



**Figura 4:** Estrutura tridimensional da AChE de *Torpedo californica*. A estrutura é apresentada como um diagrama de fitas, com o N-terminal abaixo à esquerda e o C-terminal acima à direita. A entrada da cavidade do sítio ativo apresenta-se no topo, onde o resíduo-chave do sítio aniônico periférico, triptofano 279, está presente. O resíduo-chave no subsítio aniônico, Triptofano 84, é representado em roxo. Serina 200 (pertencente ao subsítio esterásico) é representado em vermelho. Fenilalanina 288 e fenilalanina 290, que delineiam a bolsa acil, são representados em preto (SILMAN e SUSSMAN, 2005).

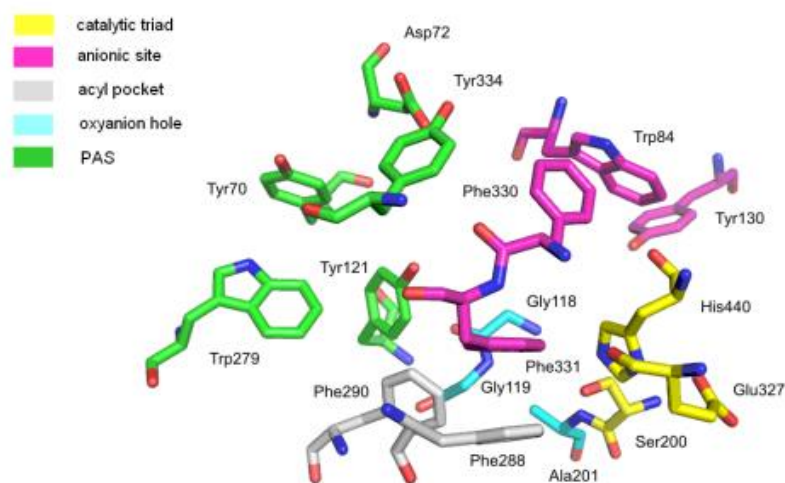
Como mostrado na Figura 4, o subsítio esterásico situa-se no fundo da cavidade (também chamado de gorge). Este sítio apresenta uma tríade catalítica de Ser 200, His 440 e Glu 327 em *Torpedo californica* (Figura 5). As posições dos resíduos podem sofrer variações interespecíficas (LINHARES, 2014; ALMEIDA, 2015).



**Figura 5:** Tríade catalítica do sítio ativo de AChE de *Torpedo californica* (VIEGAS JR et al., 2004).

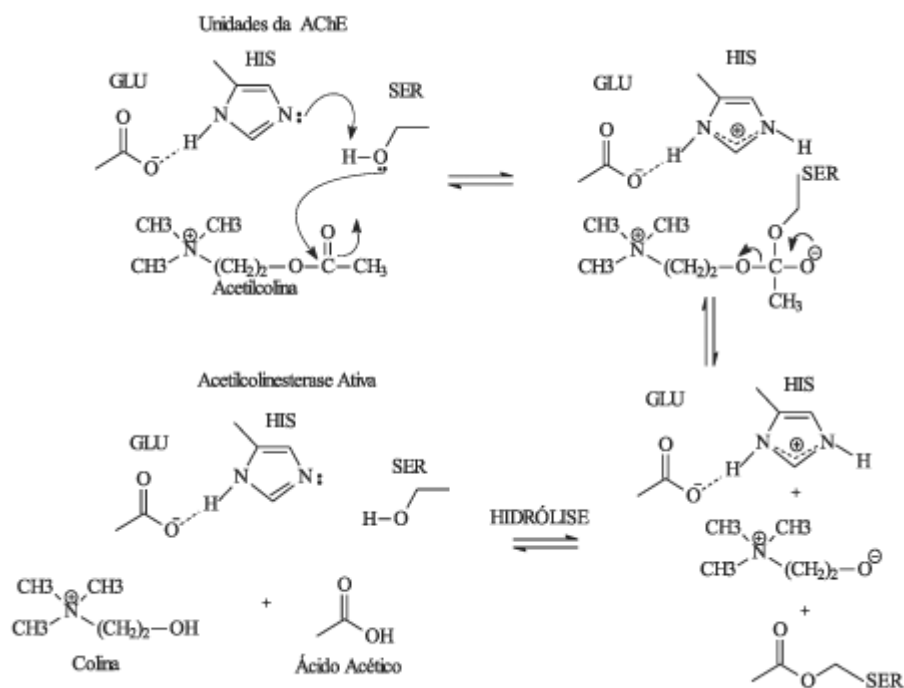
O sítio ativo de AChE contém 14 aminoácidos aromáticos e uma longa e estreita cavidade hidrofóbica que conecta a tríade catalítica ao PAS.

A bolsa acil desta enzima contém resíduos de Trp233, Phe288, Phe290 e Phe331. A cavidade oxiânion é formada pelos resíduos de Gly118, Gly119 e Ala201. O subsítio aniônico contém os resíduos de Trp84, Tyr130, Glu199, Gly441 e Ile444. O PAS contém os resíduos de Asp72, Tyr121, Ser122, Trp279, Phe330 e Tyr334 (LINHARES, 2014; ALMEIDA, 2015). Alguns dos resíduos de aminoácidos desta enzima são apresentados na Figura 6.



**Figura 6:** Sítio ativo de acetilcolinesterase de *Torpedo californica* (BADJA et al., 2013).

O sítio aniônico atrai fortemente o nitrogênio quaternário carregado positivamente da ACh. A ACh, já dentro da cavidade, sofre o ataque nucleofílico da serina, desprotonada pela histidina, ao seu carbono carbonílico, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de H e pelo glutamato. Desta forma, há formação de serina acetilada e liberação de colina. Posteriormente o grupo acetila é desligado pelo ataque nucleofílico da água havendo a formação do segundo intermediário tetraédrico com liberação de ácido acético e regeneração do sítio ativo (Figura 7) (VIEGAS JR et al., 2004; LINHARES, 2014).



**Figura 7:** Mecanismo de hidrólise da acetilcolina (Santos et al., 2007).

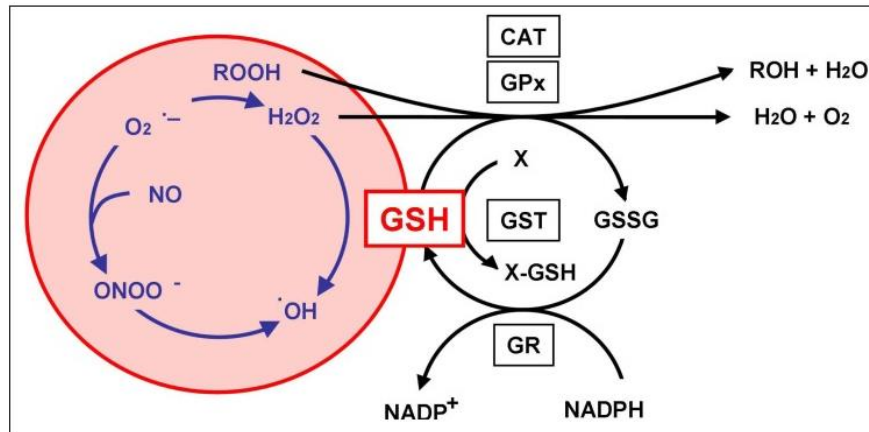
Segundo Sberna e colaboradores (1997), a atividade desta enzima é aumentada em torno das placas amilóides de pacientes com DA. Arendt e colaboradores (1992) mostraram, por sua vez, que há um aumento na forma G1 de AChE e BChE em diferentes regiões cerebrais. E, de acordo com estes autores, este aumento está relacionado à densidade de placas neuríticas que são reativadas por ambas enzimas. Por outro lado, também demonstraram uma redução seletiva na forma G4 de AChE. Corroborando este último resultado, os estudos de Ogane e colaboradores (1992) apresentaram redução maior que 70% da forma G4 ligada à membrana em pacientes com DA. Giacobini (2001) também afirma que no cérebro de pacientes com DA ocorre declínio progressivo da atividade de AChE, ao passo que a atividade de BChE é elevada.

Bono (2014) relatou que no cérebro destes pacientes a atividade da BChE está aumentada, sendo encontrada nas placas senis e nos emaranhados neurofibrilares. Em seu estudo, o autor também mostrou que a atividade plasmática da BChE é, em contrapartida, significativamente menor nos pacientes com DA, sendo que a presença da doença parece ser o principal fator de influência nessa redução. O autor acrescenta ainda que a atividade de BChE diminui com a progressão da DA.

#### **4 Antioxidantes**

Radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons não-pareados, como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), a hidroxila ( $\bullet OH$ ) e a lipoperoxila ( $LOO\bullet$ ). As principais espécies reativas do oxigênio (EROs), nitrogênio e cloro compreendem o peróxido de hidrogênio, o ácido hipocloroso e o óxido nítrico e o ânion peroxinitrito que, em excesso, estão associadas a lesões celulares como a peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas (SILVA e FERRARI, 2011). Segundo Giordano et al. (2014), a formação de EROs pode ser uma resposta precoce induzida pelo peptídeo  $A\beta$  e desempenha um papel significativo na condução da patogênese celular.

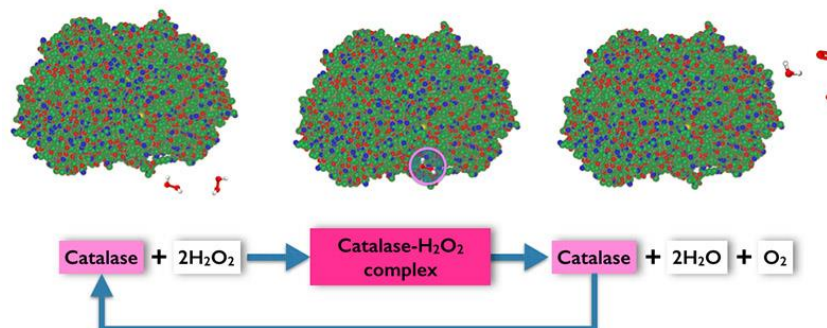
As células, entretanto, possuem um sistema de defesa antioxidante bastante eficiente que pode atuar antes mesmo que ocorra a lesão, como é o caso da proteção oferecida por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase, catalase, glutathiona peroxidase (GPx), vitamina E e outras moléculas. Neste sistema de defesa existem ainda agentes que auxiliam na reparação das lesões – como é o caso, por exemplo, do ácido ascórbico (FERREIRA e MATSUBARA (1997). Alguns antioxidantes são apresentados na Figura 8.



**Figura 8:** Catalase (CAT) degrada peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e glutatona peroxidase (GPx) degrada  $H_2O_2$  e hidroperóxidos (ROOH), neste último caso gerando alcoóis. Glutatona oxidada (GSSG) é reduzida gerando GSH por ação da glutatona redutase (GR) na presença de NADPH. Por mediação de glutatona S-transferase (GST), GSH se conjuga com compostos endógenos e xenobióticos (X). GSH também é capaz de reagir de forma não enzimática com superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico (NO), radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) e com peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (AOYAMA e NAKAKI, 2012).

#### 4.1 Catalase

A catalase é uma enzima antioxidante intracelular que catalisa a reação do peróxido de hidrogênio à água e ao oxigênio, como mostra a Figura 9. A catalase é encontrada predominantemente no interior das células nos peroxissomos, mas pode também ser encontrada livre no citoplasma e nos fagolisossomos. Sua presença evita o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem ocasionar diversos danos a estruturas celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA (SILVA e GONÇALVES, 2010; VALKO et al., 2007).



**Figura 9:** Reação de degradação do peróxido de hidrogênio através da catalase (LOVEBIOLOGY, 2016).

As catalases (EC 1.11.1.6) são classificadas em quatro grupos principais: enzimas monofuncionais clássicas ou típicas (tipo A), catalase-peroxidases (tipo B), catalases não-heme (tipo C) e proteínas diversas com atividade catalítica menor (tipo D). A quebra do peróxido de hidrogênio é a atividade predominante das catalases clássicas. Essas catalases são divididas em 2 subgrupos: um contendo subunidades pequenas (55 a 69 kDa) com heme B associado, e outro contendo subunidades grandes (75 a 84 kDa) com heme D associado. As catalases clássicas são ativas principalmente como tetrâmeros. Outras formas já foram relatadas, mas não foram caracterizadas de forma conclusiva. Estão presentes em animais, vegetais, bactérias, arqueobactérias, fungos e protistas. As catalases do tipo B, por sua vez, não são encontradas em plantas nem animais. Tanto as catalases do tipo A quanto as do tipo B possuem grupamento heme. A catalase do tipo C possui um centro binuclear de manganês no sítio ativo, ao invés do grupo heme. As enzimas do grupo D são compostas de diversas proteínas que contém grupo heme e possuem um baixo nível de atividade catalítica (BELO e SOUZA, 2016; NICHOLLS et al., 2000).

Nakamura e colaboradores (1998) fizeram um estudo comparativo entre catalases presentes em eritrócitos caninos e humanos, e nele encontraram bastante semelhança entre ambas, inclusive na sequência de aminoácidos. Entretanto, segundo os autores, a atividade de catalase em hemolisado de cães é cerca de 30 vezes menor do que em humanos.

A deficiência de catalase em eritrócitos é uma condição genética rara de caráter autossômico recessivo que pode estar presente em humanos e também em animais, como os cães (RODRIGUES E BARBONI, 1998; NAKAMURA et al., 2000). Tanto na acatalasemia humana quanto na canina foi encontrada substituição de nucleotídeos nas regiões codificantes do gene (OGATA et al., 2009). A deficiência desta enzima antioxidante parece estar relacionada a outras patologias, como a diabetes mellitus (GOTH et al., 2016).

Segundo Sofic e colaboradores (2015) e Cristalli e colaboradores (2012), a DA pode provocar alterações significativas na atividade de catalase, tanto a nível cerebral quanto a nível sanguíneo. Schrag e colaboradores (2013), entretanto, mostraram haver divergência entre resultados encontrados por diferentes autores avaliando a influência da DA na atividade eritrocitária desta enzima antioxidante.

Trabalhos anteriores demonstraram benefícios de dietas ricas em antioxidantes em pacientes com DA (COTMAN et al., 2002; SIWAK et al., 2008; COTMAN e HEAD, 2008). O uso de antioxidantes nos estudos de Cotman e colaboradores (2002) sobre disfunção cognitiva

também resultou em uma melhora significativa na capacidade de cães idosos em aprender tarefas.

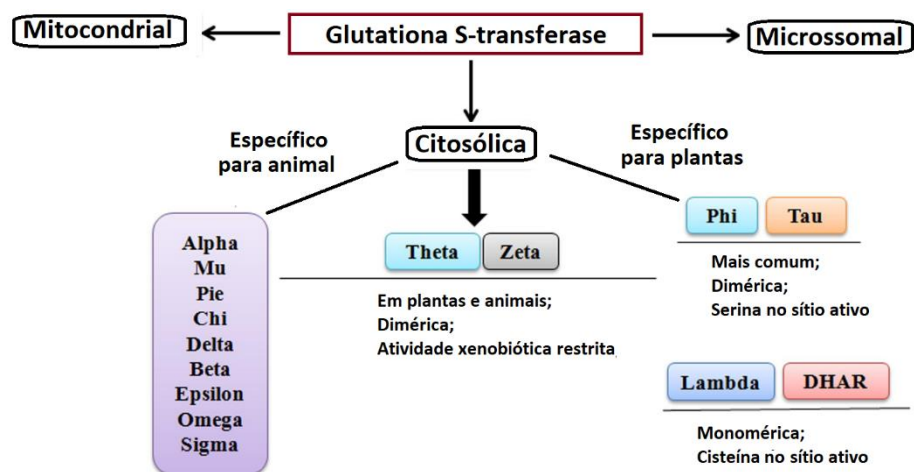
## **4.2 Glutathione S-transferase**

Biotransformação é o processo em que substâncias – como fármacos e toxinas – passam por reações bioquímicas específicas, sendo que cada etapa tem a participação de seqüências enzimáticas altamente ordenadas. Os metabólitos resultantes deste processo são geralmente mais polares que as substâncias que os originaram. Estas enzimas podem ser divididas em dois grupos: enzimas de fase I e enzimas de fase II (AUDI e PUSSI, 2000; COSTA et al., 2004). As enzimas de fase I agem sobre moléculas exógenas introduzindo grupamentos mais polares de modo a facilitar a excreção das mesmas. Enquanto isso, as enzimas de fase II ou enzimas de conjugação, como a glutathione S-transferase, são responsáveis pela conjugação de co-substratos (moléculas endógenas) a seus substratos causando também o aumento da polaridade dos mesmos e, conseqüentemente, facilitando sua excreção.

As GSTs possuem alta especificidade pela glutathione reduzida, que funciona tanto como substrato, quanto como um cofator para esta enzima. A presença do grupo sulfidril na estrutura da GSH é fundamental para a capacidade redutora da mesma. A GST funciona como catalisadora da conjugação deste grupo sulfidril com grupos eletrofílicos presentes, por exemplo, em xenobióticos. As GSTs atuam também na excreção de substâncias endógenas protegendo as células contra toxicidade química e estresse em diferentes tecidos, além de ser importante na ativação de sinais para apoptose celular e sobrevivência das células (RAZA, 2011; TORRES et al., 2004; FREITAS et al., 2008).

Embora a classificação das GSTs seja complexa e sujeita à discussão, como afirmam Freitas e colaboradores (2008), estas enzimas são categorizadas em citosólicas, microsossomais e mitocondriais. As GSTs citosólicas são ainda distribuídas em diferentes classes, como mostra a Figura 10.





**Figura 10:** Diferentes classes de glutathione S-transferase (adaptado de KUMAR e TRIVEDI, 2018).

Nos animais, as GSTs estão presentes principalmente no fígado, órgão principal para ocorrência da biotransformação. Entretanto, a GST também pode ser encontrada na bexiga urinária, no estômago, no intestino, no cérebro, no sangue, entre outros tecidos (CHICO e LISTOWSKY, 2004; PRABHU et al., 2005).

A glutathione é um tripeptídeo constituído de glutamato, cisteína e glicina. A depleção desta molécula a nível cerebral é considerada um sinal pré-clínico em doenças neurodegenerativas relacionadas à idade (AOYAMA e NAKAKI, 2012). E, segundo Saharan e Mandal (2014), a interrupção na homeostase de GSH pode contribuir para a patologia da DA. Segundo Panza e colaboradores (2009) e Pocernich e Butterfield (2012), a atividade de GST no hipocampo também é reduzida em doenças como a DA. Por outro lado, os resultados de Sultana e Butterfield (2004) mostraram aumento do nível de GST cerebral na DA. Oliveira e colaboradores (2016) desenvolveram um biosensor capaz de detectar a reação entre GSH e GST e, segundo Freire (2016), uma vez que este dispositivo detecta moléculas relacionadas com a DA, pode vir futuramente a ser utilizado em seu diagnóstico.

Embora diversas pesquisas relacionem polimorfismos em GST com o risco para a DA, a meta-análise realizada por Wang (2015) sugeriu não haver associação entre polimorfismos das diferentes GSTs estudadas (GSTM1, GSTT1, GSTM3, GSTP1, GSTO1) e o risco para esta doença.

Apesar das discrepâncias encontradas em estudos que relacionam a DA e as enzimas aqui destacadas - acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, catalase e glutathione S-transferase -, é possível notar forte indício de que esta doença pode influenciar e/ou ser influenciada pela atividade das mesmas. Desta forma, o presente trabalho se baseia nestas

atividades enzimáticas para contribuir nos estudos sobre formas de tratamento e de diagnóstico mais eficazes para a DCC e também para a DA.

## **CAPÍTULO I**

### **ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE ENZIMAS SANGUÍNEAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES ESTÁGIOS DA DCC**

## RESUMO

A Disfunção Cognitiva Canina (DCC) é uma patologia com diagnóstico principalmente clínico, sendo frequente a ocorrência de diagnósticos bastante tardios. Desta forma, este capítulo teve como objetivo o estudo da influência da DCC sobre enzimas sanguíneas, visando a busca de biomarcadores que possam facilitar este diagnóstico. Alterações em enzimas que hidrolisam acetilcolina [acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)] e em enzimas antioxidantes [como catalase e glutathione S-transferase (GST)] têm sido demonstradas na Doença de Alzheimer em alguns estudos. Assim, as atividades destas enzimas no sangue de 48 cães divididos em 5 grupos (controle; risco para DCC; DCC leve; DCC moderada; e DCC avançada) foram analisadas. As atividades enzimáticas de colinesterases foram avaliadas pelo método de Ellman (1961); as atividades de catalase pelo método de Nelson e Kiesow (1972); e as atividades de GST pelo método de Habig (1974). Não houve diferença significativa entre as atividades destas enzimas nos cinco diferentes grupos estudados, entretanto foi possível observar alteração nas atividades médias de colinesterases (utilizando acetiltiocolina como substrato), catalase e GST. Desta forma, é possível sugerir que, embora estas enzimas não sejam a princípio apropriadas como biomarcadores da DCC, elas podem futuramente vir a ser usadas como ferramenta de auxílio na análise da evolução da doença e na avaliação da resposta ao tratamento utilizado. Para que isto ocorra, é necessário o avanço dos estudos destas enzimas em animais portadores desta disfunção.

**Palavras-chave:** biomarcadores; colinesterases; antioxidantes.

## ABSTRACT

The Canine Cognitive Dysfunction (CCD) is a pathology with mainly clinical diagnosis, being frequent the occurrence of diagnoses quite late. Thus, this chapter aims to study the influence of CCD on blood enzymes, aiming the search for biomarkers that may facilitate this diagnosis. Changes in enzymes that hydrolyze acetylcholine [acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE)] and in antioxidant enzymes [such as catalase and glutathione S-transferase (GST)] have been demonstrated in Alzheimer's Disease in some studies. Thus, the activities of these enzymes in the blood of 48 dogs divided into 5 groups (control, risk for CCD, mild CCD, moderate CCD, and severe CCD) were analyzed. The enzymatic activities of cholinesterases were evaluated by the method of Ellman (1961); catalase activities by the method of Nelson and Kiesow (1972); and the GST activities by the method of Habig (1974). There was no significant difference between the activities of these enzymes in the five different groups studied, however, it was possible to observe alterations in the average activities of cholinesterases (using acetylthiocoline as substrate), catalase and GST. In this way, it is possible to suggest that, although these enzymes are not at first appropriate as biomarkers of CCD, they can be used as an aid in the analysis of the disease evolution and in the evaluation of the response to the treatment used. For this to occur it is necessary to advance the studies of these enzymes in animals with this dysfunction.

**Keywords:** biomarkers; cholinesterases; antioxidants

## 1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de contribuir para o diagnóstico da DCC. Atualmente, a dificuldade em se identificar alterações neurológicas e neuroquímicas nas estruturas cerebrais tem feito com que o diagnóstico desta disfunção muitas vezes se baseie na identificação das alterações comportamentais dos pacientes (TRAVANCINHA, 2014). Desta forma, questionários com perguntas pertinentes feitas aos tutores – que avaliam a qualidade do sono, as alterações no comportamento do animal, entre outros fatores (PANTOJA, 2010) - têm sido bastante utilizados.

Novos trabalhos no ramo da Medicina Veterinária vêm discutindo as desvantagens de se utilizar os questionários como único meio para o diagnóstico, por se tratarem de medidas subjetivas. Chapagain e colaboradores (2018), por exemplo, sugerem o uso de questionários junto de testes neuropsicológicos, onde se pode avaliar, entre outras condições, a memória do animal e a aprendizagem espacial. Outros testes que podem ser utilizados são o teste de interação com humanos e o teste do espelho, que permite avaliar a reação do animal ao seu reflexo. No estudo de Siwak (2002), cães com DCC tiveram uma reação mais prolongada ao seu reflexo que cães sem a disfunção.

Outros exames utilizados para auxiliar o diagnóstico desta patologia são as avaliações neurológicas e os exames laboratoriais, que também são importantes para diagnósticos diferenciais como de neoplasias cerebrais e meningoencefalite granulomatosa. Também podem ser utilizados os exames de imagem, como radiografia, ecografia, tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM). Para o diagnóstico de DCC são destacados os dois últimos (TRAVANCINHA, 2014). Estudos recentes têm buscado novas alterações de imagem que podem ser encontradas em animais com DCC, como a avaliação da adesão intertalâmica estudada por Noh e colaboradores (2017). Segundo estes autores, os resultados por eles encontrados apoiam o uso de parâmetros como a espessura da adesão intertalâmica na análise da atrofia cerebral em cães com DCC.

Atualmente ainda faltam ferramentas de diagnóstico que possam garantir a presença da doença ou fornecer uma identificação precoce de seus sinais. Assim, um diagnóstico definitivo desta patologia apenas pode ser obtido através de uma análise histopatológica do tecido cerebral, após necropsia do animal (HEATH, 2002; PINEDA et al., 2014).

O diagnóstico da DA se faz de forma semelhante ao da DCC, sendo também um diagnóstico do tipo clínico, como destaca a Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAz)

(2019). Também é comum o uso de testes cognitivos e questionários, como o Questionário de Atividades Funcionais Pfeffer (PFEFFER et al, 1982). Este questionário consiste em 10 questões abrangendo a independência funcional do indivíduo dentro de atividades do dia-a-dia, com quatro possibilidades de respostas cada, pontuadas de 0 a 3. A pontuação máxima do instrumento é de 30 pontos, indicando maior dependência funcional. Por exemplo: “Ele manuseia seu próprio dinheiro?” A pontuação zero seria para resposta “normal” e a pontuação 3 para a resposta “não é capaz”. Também são usados diferentes tipos de exames complementares como a tomografia computadorizada, a ressonância magnética, exame do líquido cefalorraquidiano e estudo genético (GONÇALVES e CARMO, 2012).

Embora o diagnóstico clínico da DA seja fundamental, é importante salientar que há fases na doença onde não há evidência de sintomas cognitivos. Assim, são reconhecidos três estágios para a DA: 1- fase pré-clínica (sem manifestação de sintomas clínicos); 2 - comprometimento cognitivo leve (presença de sintomas cognitivos leves); 3 – demência da Doença de Alzheimer (comprometimento mais evidente) (CARLETTI-CASSANI, 2019; MCKHANN et al., 2011). Desta forma, faz-se necessário o uso de outras formas de diagnóstico além do estudo de sinais clínicos. Como afirmam Gonçalves e Carmo (2012), é possível um diagnóstico mais precoce através do uso de exames de imagem e do estudo de biomarcadores.

Quanto ao uso de marcadores biológicos, a ABRAZ já destaca o uso de A $\beta$  e da proteína Tau fosforilada no líquido, como forma de auxiliar um diagnóstico mais preciso para a DA. Entretanto, a Associação também aponta que a alteração das concentrações destes marcadores por si não garante o diagnóstico desta doença. Estas alterações precisam ser correlacionadas com os sintomas clínicos (ABRAZ, 2019). Vale ressaltar, entretanto, que as pesquisas de biomarcadores para a DA vêm avançando bastante ao longo do tempo, bem como outras formas complementares a este tipo de diagnóstico como, por exemplo, o uso de redes neurais convolucionais (RNC). RNC são redes neurais artificiais utilizadas para processamento e análise de imagens digitais. Segundo Folego (2018), este tipo de ferramenta pode reduzir a dificuldade da identificação de biomarcadores estruturais da DA em imagem por RM.

Os biomarcadores são substâncias biológicas capazes de indicar presença ou início de um determinado distúrbio, podendo auxiliar no diagnóstico precoce e no estabelecimento de padrões para o desenvolvimento de novos tratamentos (RACHAKONDA et al., 2004). Dentre os biomarcadores estudados na DA também é possível citar, além da proteína tau fosforilada ou de agregados de peptídeo A $\beta$  (RACHAKONDA et al., 2004), determinados microRNAs que podem estar desregulados ou a redução a nível plaquetário de ADAM10 em pacientes com DA.

A ADAM10 é uma  $\alpha$ -secretase que cliva a APP através do caminho não amiloidogênico, inibindo, desta forma, a produção do peptídeo A $\beta$  na DA (MORALLES, 2016).

Outros biomarcadores estudados são metabólitos que podem ser analisados através de espectroscopia de prótons, como o N-acetilaspártato (NAA). Este metabólito pode se mostrar reduzido em pacientes com DA, segundo Azevedo e colaboradores (2005). Estudos genéticos também têm demonstrado a relação direta entre a DA e mutações em genes - como o gene codificador de APP e genes da presenilina 1 e 2 - e presença de polimorfismo do gene que codifica a apolipoproteína E (STARLING, 2012). Segundo Caramelli e colaboradores (2011), entretanto, a genotipagem da apolipoproteína E ou de outros polimorfismos de susceptibilidade não é recomendada com finalidade diagnóstica ou para risco de desenvolvimento da DA.

Quanto ao uso de biomarcadores para o diagnóstico de DCC, González-Martínez e colaboradores (2011) realizaram um estudo com o objetivo de comparar os níveis de A $\beta$  no plasma de cães com e sem DCC. Os resultados obtidos revelaram que os níveis desta substância no plasma diferem com a idade e mostram também correlação com o grau e intensidade de DCC. Entretanto, o uso de biomarcadores de diagnóstico para DCC ainda não são de uso comum nas clínicas.

Devido à importância neurológica das enzimas sanguíneas butirilcolinesterase, acetilcolinesterase, catalase e GST, além do possível envolvimento das mesmas em doenças como DA e DCC, este trabalho pretende avaliar a possibilidade do uso das mesmas como biomarcadores sanguíneos auxiliares ao diagnóstico de tais patologias.



## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Aprovação pelo Comitê de Ética**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) no Instituto de Veterinária da UFRRJ. Protocolo nº 1916200116 (Anexo A). Tanto os ensaios realizados no Capítulo I quanto no Capítulo II foram aprovados pelo CEUA.

### **2.2 Coleta de sangue de cães e definição de grupos**

Foi realizada uma divulgação deste trabalho para tutores do estado do Rio de Janeiro visando a obtenção de animais voluntários. Para isso foi feito um folder (Anexo B) para auxiliar esta campanha. Os animais deveriam ter 8 anos ou mais, poderiam ser de ambos os sexos e de qualquer raça.

Foram obtidas amostras de sangue de 48 cães, após autorização dos respectivos tutores e assinatura dos termos de consentimento (Anexo C). Para análise de BChE, AChE e GST foram utilizados tubos do tipo Vacutainer® sem anticoagulante e para análise de catalase tubos contendo EDTA.

Todos os tutores preencheram uma ficha de cadastro (Anexo D) e uma ficha comportamental (Anexo E), que foram utilizadas para complementaridade das informações contidas nos questionários. O questionário 1 (Q1) (Anexo F) foi baseado no questionário proposto por Rofina e colaboradores (2006) e, no presente trabalho, foram acrescentadas duas perguntas descritas no questionário de Pantoja (2010). Entretanto, não foi acrescentada nenhuma pontuação referente a estas perguntas adicionais. O questionário 2 (Q2) (Anexo G) foi proposto por Salvin e colaboradores (2011).

Os animais foram separados em 5 grupos baseando-se nos trabalhos de Schutt et al. (2015), Fast et al. (2013), Salvin et al. (2011) e Rofina et al. (2006).

- 1) Grupo controle: animais com pontuação 10 no questionário 1, independente da pontuação obtida no questionário 2.

- 2) Grupo de risco para DCC: animais com pontuação entre 11 e 15 no questionário 1, independente da pontuação obtida no questionário 2.
- 3) Grupo DCC leve: animais com pontuação a partir de 16 no Questionário 1. No Questionário 2, os animais deste grupo deveriam apresentar pontuação até 49 e/ou não apresentar dificuldade em encontrar comida deixada no chão e em reconhecer pessoas ou animais familiares.
- 4) Grupo DCC moderado: animais com pontuação a partir de 16 no questionário 1 e a partir de 50 no questionário 2, devendo apresentar dificuldade em encontrar comida deixada no chão, mas sem falha no reconhecimento de pessoas ou animais familiares.
- 5) Grupo DCC avançado: animais com pontuação a partir de 16 no questionário 1 e a partir de 50 no questionário 2 devendo apresentar falha no reconhecimento de pessoas ou animais familiares.

Esta pontuação final se refere ao somatório de pontuações individuais de cada questão. Os valores referentes a cada opção apresentam-se entre parênteses no final de cada frase dos questionários em anexo.

## **2.3 Ensaio enzimáticos**

### **2.3.1 Preparo de soro para ensaio das colinesterases e de GST**

Após a coleta, a amostra de sangue foi centrifugada a 3500 rpm durante 15 minutos para obtenção do soro. Para os ensaios de colinesterases, o soro foi diluído com tampão de ensaio correspondente (diluição 1:10).

### **2.3.2 Determinação da atividade de colinesterases**

A presença da atividade das colinesterases em soro diluído foi determinada utilizando o método de Ellman (1961) modificado. O soro foi adicionado a poços de uma placa de ELISA contendo tampão de ensaio (fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5). Posteriormente foi adicionado DTNB

0,32 mM dissolvido em tampão. O ensaio foi iniciado pela adição do substrato iodeto de butiriltiocolina 0,6 mM ou iodeto de acetiltiocolina 1,5 mM, obtendo assim um volume reacional de 220  $\mu\text{L}$ . A densidade ótica dos meios reacionais foi medida em intervalos de 10 segundos durante 100 segundos a 412 nm, em um espectrofotômetro. O coeficiente de absorvidade molar utilizado foi de  $14,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , como sugerido por Eyer e colaboradores (2003). Os meios referentes ao ensaio dos brancos não tiveram adição de soro.

### **2.3.3 Determinação da atividade de glutathiona S-transferase**

A presença da atividade de GST em soro foi determinada através do método de Habig (1974). O soro foi adicionado a uma cubeta contendo tampão de ensaio (fosfato de potássio 0,1 M pH 6,1). Posteriormente foi adicionada glutathiona reduzida (GSH) 5 mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 2 mM, obtendo-se volume reacional de 600  $\mu\text{L}$ . A densidade ótica dos meios reacionais na placa foi medida em intervalos de 30 segundos durante 180 segundos a 340 nm. O coeficiente de absorvidade molar utilizado foi de  $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Os meios referentes ao ensaio dos brancos não tiveram adição de soro.

### **2.3.4 Preparo de sangue total para ensaio de catalase**

Para este ensaio foi utilizado sangue total, como descrito por Basso e colaboradores (2014). Para ocorrência de lise, a amostra foi congelada e no momento do ensaio enzimático, o sangue foi diluído a 1:40 em tampão de ensaio (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0).

### **2.3.5 Determinação da atividade de catalase**

A atividade de catalase foi determinada pelo método de Nelson e Kiesow (1972), com modificações, utilizando peróxido de hidrogênio a 12 mM como substrato. A amostra de

sangue total diluída foi adicionada ao tampão de ensaio e posteriormente o substrato da reação também foi adicionado, obtendo assim, um volume reacional de 600  $\mu\text{L}$ . A densidade ótica dos meios reacionais foi medida em intervalos de 10 segundos durante 100 segundos a 240 nm. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de  $18 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , como descrito por Andrade (2013). Os meios referentes ao ensaio dos brancos não tiveram adição de sangue.

## **2.4 Análise estatística**

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste Student-Newman-Keuls (SNK) ao nível de significância de 5% foi utilizado para comparação das médias. Para as análises de correlação também foi considerado o nível de significância de 5%.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Separação dos grupos e escores obtidos nos questionários**

Para organização dos grupos foram selecionados os questionários propostos por Rofina et al. (2006) e Salvin et al. (2011). Segundo Schutt e colaboradores (2015), estes dois questionários parecem ser igualmente eficazes na definição de casos verdadeiros de DCC.

Uma vez que não foi encontrada na literatura uma forma de classificar os animais com DCC em diferentes estágios da doença a partir destes dois questionários em conjunto, este trabalho apresenta um novo modelo de separação de grupos. O grupo controle ficou composto por animais com pontuação 10 no Q1. O grupo de risco para DCC foi composto por animais com pontuação entre 11 e 15 no Q1. O grupo DCC leve ficou com os animais com pontuação a partir de 16 no Q1 e pontuação até 49 no Q2. Animais com pontuação a partir de 16 no Q1, pontuação a partir de 50 no Q2 e que não apresentavam dificuldade em encontrar comida deixada no chão e falha no reconhecimento de pessoas ou animais familiares - perguntas descritas no Q2 - também foram incluídos neste grupo. O grupo DCC moderado foi composto pelos animais com pontuação a partir de 16 no Q1 e a partir de 50 no Q2, e que apresentavam dificuldade em encontrar comida deixada no chão, mas que não tinham dificuldade no reconhecimento de pessoas ou animais familiares. O grupo DCC avançado, por sua vez, foi composto pelos animais com pontuação a partir de 16 no questionário 1 e a partir de 50 no questionário 2 e que apresentavam dificuldade no reconhecimento de pessoas ou animais familiares.

A classificação dos grupos “Controle” e “Risco” foi baseada no trabalho de Fast e colaboradores (2013), em que os animais foram classificados como “Controle” apenas quando não apresentaram nenhuma alteração relacionada aos itens avaliados no Questionário de Rofina et al. (2006), denominado aqui como Questionário 1. Estes itens se referem à presença de desorientação e comportamento repetitivo; alteração no ciclo de sono e vigília; comportamento ligado aos processos de urina e defecação, ingestão de água e apetite; interação social; perda de percepção; memória; e personalidade.

Os animais que apresentaram anormalidades em um ou mais itens, mas que obtiveram uma pontuação de no máximo 15 neste questionário, foram classificados como DCC borderline por Fast e colaboradores (2013). Estes autores se inspiraram no termo empregado na geriatria humana “Comprometimento Cognitivo Leve” que está relacionado a um risco aumentado de desenvolvimento

do Alzheimer, como apontam Boyle e colaboradores (2006). No presente trabalho estes animais com pontuação de até 15 em Q1 foram classificados como Grupo de Risco.

Animais com pontuação acima de 15 foram classificados como portadores de DCC. Para separação dos grupos de animais com DCC em três diferentes estágios (leve, moderado e avançado) foi utilizado o questionário aqui denominado como Questionário 2, proposto por Salvin et al. (2011).

Animais classificados no grupo “DCC leve” apresentaram pontuação de até 49 em Q2 ou não apresentaram anormalidade nas questões referentes ao reconhecimento de pessoas ou animais familiares. Esta classificação se baseou no próprio trabalho de Salvin e colaboradores (2011), que apontaram a dificuldade em encontrar comida no chão como item de gravidade moderada e falha no reconhecimento de pessoas ou animais familiares como item de gravidade severa. Esta observação por parte dos autores do Questionário 2, portanto, também foi utilizada na classificação dos grupos de “DCC moderada” e “DCC avançada” no presente trabalho. Além disso, para fazer parte destes dois últimos grupos também foi necessário que os animais apresentassem pontuação a partir de 50 no Questionário 2, uma vez que, segundo Salvin et al. (2011), este é o limiar ideal de diagnóstico para a DCC.

As pontuações obtidas pelos animais do presente estudo encontram-se na Tabela 1, organizadas entre os cinco grupos formados.

**Tabela 1:** Pontuações obtidas pelos 48 animais do presente estudo em Q1 (Questionário 1) e Q2 (Questionário 2), propostos, respectivamente, por Rofina et al. (2016) e Savin et al. (2011). Q1 e Q2 estão anexados no final deste trabalho (Anexos F e G, respectivamente).

QUESTIONÁRIOS		
NOME	Q1	Q2
<i>GRUPO CONTROLE</i>		
Animal1	10	34
Animal2	10	34
Animal3	10	38
Animal4	10	NR
Animal5	10	NR
Animal6	10	NR
Animal7	10	NR
Animal8	10	NR
Animal9	10	NR
Animal10	10	NR
Animal11	10	NR
Animal12	10	NR
Animal13	10	NR
Animal14	10	NR

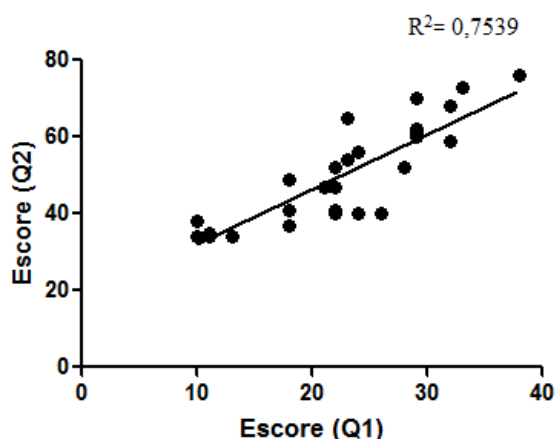
Animal15	10	34
<i>GRUPO DE RISCO</i>		
Animal16	11	35
Animal17	13	NR
Animal18	14	NR
Animal19	13	34
Animal20	15	NR
Animal21	11	34
Animal22	13	NR
Animal23	12	NR
Animal24	14	NR
<i>GRUPO DCC LEVE</i>		
Animal25	18	41
Animal26	22	41
Animal27	22	40
Animal28	18	37
Animal29	26	40
Animal30	24	40
Animal31	22	47
Animal32	21	47
Animal33	22	47
Animal34	18	49
<i>GRUPO DCC MODERADA</i>		
Animal35	29	60
Animal36	28	52
Animal37	24	56
Animal38	28	52
Animal39	23	54
Animal40	22	52
<i>GRUPO DCC AVANÇADA</i>		
Animal41	23	65
Animal42	29	61
Animal43	29	70
Animal44	32	68
Animal45	38	76
Animal46	29	62
Animal47	32	59
Animal48	33	73

NR: Não respondido.

Como pode ser observado na Tabela 1, muitos tutores dos cães dos grupos “Controle” e “Risco para DCC” não responderam o Questionário 2. O Questionário 2 foi facultativo para animais

com pontuação até 15 no Questionário 1. Esta escolha de tornar o segundo questionário opcional teve como objetivo aumentar a adesão de tutores à nossa pesquisa, uma vez que muitos consideraram o Questionário 2 demasiadamente longo.

Neste trabalho foi realizado o estudo sobre a associação dos escores obtidos nos dois questionários para investigar a possibilidade de uma correlação linear entre essas duas variáveis. A Figura 1 apresenta esse resultado.



**Figura 1:** Relação entre os questionários Q1 (ROFINA et al., 2006) e Q2 (SALVIN et al., 2011);  $p < 0,05$ .

Como pode ser observado na Figura 1, há uma correlação positiva forte entre os escores obtidos nos dois questionários ( $R^2 = 0,7539$ ), segundo a classificação de Monteiro e colaboradores (2014). Desta forma, é possível afirmar, por exemplo, que um paciente com pontuação elevada no Q2, provavelmente também tem uma pontuação elevada no Q1.

Após a entrevista e execução dos questionários com os tutores e após as observações clínica e neurológica dos animais, amostras de sangue foram coletadas para posterior análise das atividades das colinesterases utilizando dois diferentes substratos e para análise das atividades de catalase e GST.

### 3.2 Atividades enzimáticas



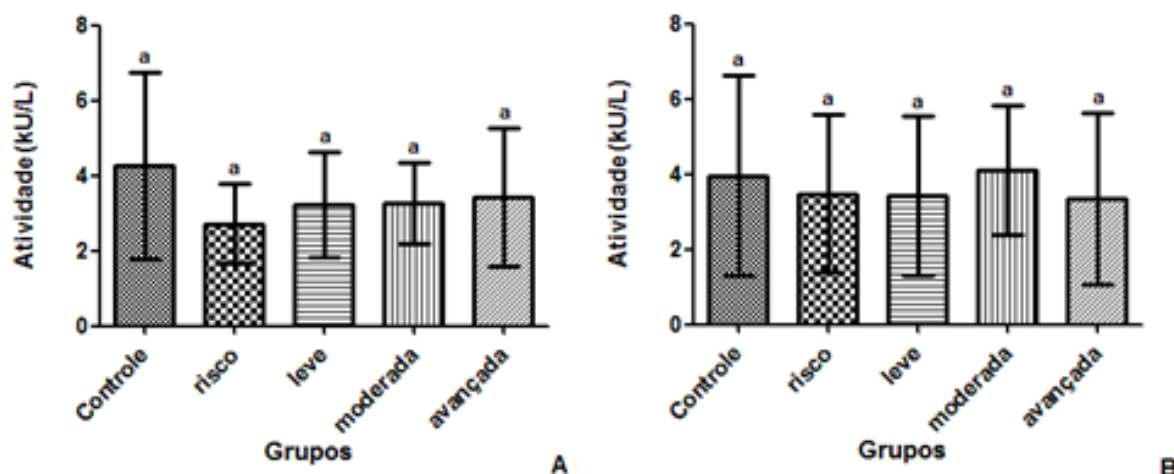
As atividades enzimáticas obtidas são apresentadas na Tabela 2 (Anexo H). A atividade de algumas amostras foi considerada inconclusiva por conterem aparência inapropriada para a análise ou absorvências apresentando instabilidade excessiva. Algumas atividades não foram avaliadas por falta de volume suficiente de amostra, já que a coleta de sangue de alguns animais se mostrou um pouco dificultada e alguns tutores não concordaram com a realização de nova coleta.

### **3.2.1 Colinesterases**

Conforme descrito por Tecles e colaboradores (2002), o ensaio de colinesterases em sangue canino foi realizado com dois diferentes substratos: acetiltiocolina e butiriltiocolina. Ao fazer uso da acetiltiocolina no ensaio, tanto AChE quanto BChE são capazes de realizar a hidrólise do substrato, uma vez que não foi utilizado um inibidor específico para a BChE (YAMAMOTO et al., 1990). Embora a acetilcolinesterase hidrolise a acetilcolina com maior eficiência, deve-se levar em consideração que em soro, o nível de butirilcolinesterase é significativamente superior ao de AChE. Enquanto isso, ao utilizar a butiriltiocolina como substrato, a hidrólise foi feita preferencialmente pela BChE, já que, segundo Tecles e colaboradores (2000), esta enzima possui alta afinidade por este substrato, enquanto AChE não hidrolisa butirilcolina de forma significativa.

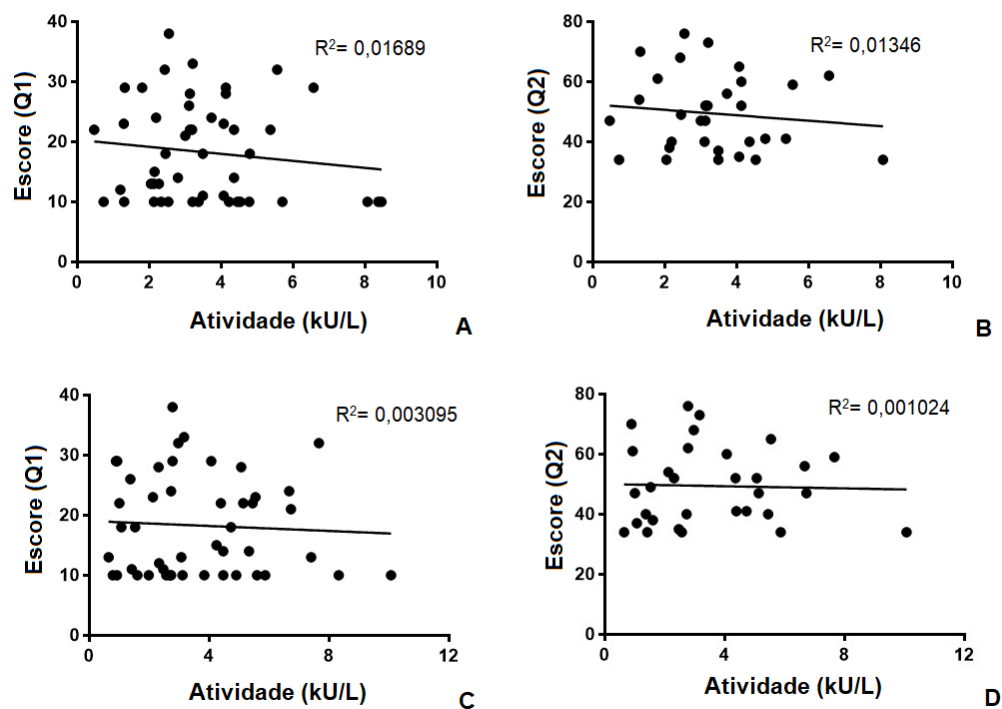
Desta forma, foram utilizados estes dois tipos de substratos visando observar a atividade das duas colinesterases em conjunto e, no segundo caso, da atividade de BChE destacada.

Após padronização dos dois ensaios, foram feitas as análises comparativas entre as atividades obtidas pelos animais dos cinco grupos (Figura 2 A e B).



**Figura 2:** Atividade sérica de colinesterases utilizando acetiltiocolina (A) ou butiriltiocolina (B) como substrato. Colunas com mesma letra não apresentaram diferença significativa no teste Student-Newman-Keuls (SNK),  $\alpha=0,05$ .

Segundo Furlanello (2006) existem poucos estudos sobre os níveis de referência da atividade de colinesterase em cães, e Saccaro (2007) constatou que os níveis basais de BChE podem variar de forma significativa entre os animais. Esta variação também pode ser constatada através dos dois gráficos da Figura 2. Uma vez que os animais controles apresentam ampla variação na atividade enzimática entre eles, isso dificulta a avaliação do comportamento destas enzimas nos diferentes estágios da doença. Desta forma, comparando estatisticamente as atividades nos diferentes grupos, não foi possível observar diferença significativa. Assim, ao estudar a possibilidade de correlação linear entre a atividade das colinesterases e os escores obtidos nos dois questionários, foi possível observar também que não há correlação linear significativa entre estas variáveis, como mostra a Figura 3.



**Figura 3:** Relação entre atividade das colinesterases em soro canino e os questionários 1 (ROFINA et al., 2006) e 2 (SALVIN et al., 2011). A) Uso do substrato acetiltiocolina e escore obtido no Questionário 1. B) Uso do substrato acetiltiocolina e escore obtido no Questionário 2. C) Uso do substrato butiriltiocolina e escore obtido no Questionário 1. D) Uso do substrato butiriltiocolina e escore obtido no Questionário 2.  $p > 0,05$  (A);  $p > 0,05$  (B);  $p > 0,05$  (C);  $p > 0,05$  (D).

Apesar das atividades das colinesterases não se associarem significativamente de forma linear com os questionários, é possível observar que ao usar o substrato acetiltiocolina, as médias das atividades dos quatro grupos não-controles (Risco, DCC leve, DCC moderada e DCC avançada) foram menores que as do grupo Controle, como mostra a Tabela 2.1.

**Tabela 2.1:** Atividades médias de COL utilizando ACh como substrato (dados retirados da Tabela 2 – Anexo H).

Atividade de COL (ACh)	Controle (kU/L)	Grupo de Risco (kU/L)	DCC leve (kU/L)	DCC moderada (kU/L)	DCC avançada (kU/L)
Média	4,28	2,72	3,24	3,27	3,44
Desvio-padrão	2,48	1,05	1,41	1,06	1,84

COL (ACh): Colinesterases utilizando acetiltiocolina como substrato.

Acredita-se que a DCC possa influenciar a atividade das colinesterases, porém como há ampla variação entre a atividade dos animais de um mesmo grupo – inclusive no controle -, esta análise acaba sendo dificultada. Sugere-se que com um estudo utilizando número maior de animais seja possível analisar melhor esta influência. Acredita-se também que um estudo avaliando os níveis da atividade das colinesterases em diferentes fases dessa disfunção em um mesmo animal possa evidenciar melhor a possibilidade ou não do uso destas enzimas como ferramenta de auxílio no diagnóstico/prognóstico da DCC.

Diversos pesquisadores têm estudado as atividades de colinesterases em pacientes com Doença de Alzheimer. Bawaskar e colaboradores (2015) registraram que o nível de AChE no plasma e em eritrócitos de pessoas com Alzheimer familiar é abaixo do normal. Inestrosa e colaboradores (1994) encontraram redução do nível de AChE em linfócitos de pacientes com DA, entretanto reportaram não haver diferença significativa na atividade de AChE em plasma, plaquetas e eritrócitos em pessoas com ou sem DA. Yamamoto e colaboradores (1990) demonstraram haver um decréscimo no soro de AChE G4 em pacientes com DA. Os estudos de Garcia Ayllon e colaboradores (2010), por sua vez, apresentaram aumento da atividade de AChE em plasma de pacientes com DA que, segundo estes autores, correlaciona-se com aumento das isoformas G1 e G2 encontradas nos cérebros de pacientes com DA.

A Tabela 2.2 apresenta os valores de médias das atividades de colinesterases utilizando BCh como substrato. Nesta tabela é possível observar que não há diferença expressiva na atividade enzimática entre os diferentes grupos, assim como foi observado anteriormente na Figura 2 B.

**Tabela 2.2:** Atividades médias de COL utilizando BCh como substrato (dados retirados da Tabela 2 – Anexo H).

Atividade de COL (BCh)	Controle (kU/L)	Grupo de Risco (kU/L)	DCC leve (kU/L)	DCC moderada (kU/L)	DCC avançada (kU/L)
Média	3,96	3,49	3,41	4,10	3,34
Desvio-padrão	2,65	2,1	2,12	1,72	2,27

COL (BCh): Colinesterases utilizando butiriltiocolina como substrato.

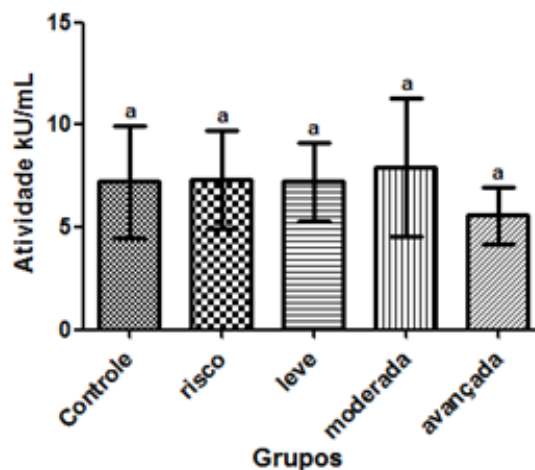
Garcia Ayllon e colaboradores (2010) também demonstraram não haver diferença significativa desta atividade no plasma de pacientes com DA. Inestrosa e colaboradores (1994) também não encontraram diferença significativa desta enzima no plasma e em plaquetas. Em linfócitos e em eritrócitos, entretanto, estes autores reportaram uma redução nesta atividade. Bono (2014) em seus estudos com DA também encontrou redução da atividade desta enzima no plasma de pacientes com a doença.

É necessário também observar a presença de outras patologias que podem influenciar os valores desta atividade enzimática. Cardiopatias e obesidade, por exemplo, podem acarretar um aumento nesta atividade (BAGATINI, 2010; BOBERGE et al., 2010). Presença de processos inflamatórios e diabetes também podem influenciar estes valores (DAS, 2007; ABBOTT et al., 1993). Desta forma, a butirilcolinesterase não se mostrou como biomarcador sensível, nem tampouco específico, para a DCC.

### 3.2.2 Catalase

Inicialmente foram feitos os procedimentos necessários para padronização do ensaio de catalase em sangue total de cão. Vale ressaltar que, como demonstrado por Bolzán e colaboradores (1992), a atividade de catalase em sangue total é positivamente correlacionada à atividade desta enzima em eritrócitos.

Posteriormente foi feita a análise da atividade de catalase nos animais deste estudo, como mostra a Figura 4. A atividade de catalase em sangue total foi expressa em U/mL, como preconizado por Estevão (2011).



**Figura 4:** Atividade de catalase em sangue total de cães. Colunas com mesma letra não apresentaram diferença significativa no teste Student-Newman-Keuls (SNK),  $\alpha=0,05$ .

A atividade de catalase em eritrócitos caninos é baixa em relação a atividade em seres humanos, segundo Nakamura e colaboradores (1998). De acordo com estes autores isto acontece devido à menor quantidade de catalase nestas células em cães e também devido à atividade específica inferior desta enzima nestes animais.

Através da análise da Figura 4, é possível observar que, embora não haja diferença estatisticamente significativa entre as atividades dos cinco grupos, há uma discreta redução na atividade de catalase no grupo de cães com DCC no estágio avançado da doença. Esta redução também é percebida na análise da Tabela 2.3 que mostra que a média do grupo DCC avançada é menor que a do controle e a dos outros três grupos estudados.

**Tabela 2.3:** Atividades médias de catalase (CAT) (dados retirados da Tabela 2 - Anexo H).

Atividade de CAT	Controle (kU/mL)	Grupo de Risco (kU/mL)	DCC leve (kU/mL)	DCC moderada (kU/mL)	DCC avançada (kU/mL)
Média	7,22	7,33	7,22	7,93	5,57
Desvio-padrão	2,72	2,43	1,89	3,40	1,40

Esta redução, embora sem significado estatístico, pode representar um efeito secundário a um esgotamento nos níveis de cofatores da enzima, como o Fe, como destacado por Vural e colaboradores (2010). Estes autores encontraram redução nos níveis de ferro plasmático em pacientes com DA.

Vural e colaboradores (2010) encontraram redução nesta atividade enzimática em eritrócitos humanos. Os estudos de Sofic e colaboradores (2015) utilizando estreptozotocina em ratos visando simular a DA, também observaram redução da atividade de catalase em três regiões cerebrais. Puertas e colaboradores (2012) demonstraram que a DA provocou redução significativa da atividade plasmática de catalase em homens, mas não em mulheres.

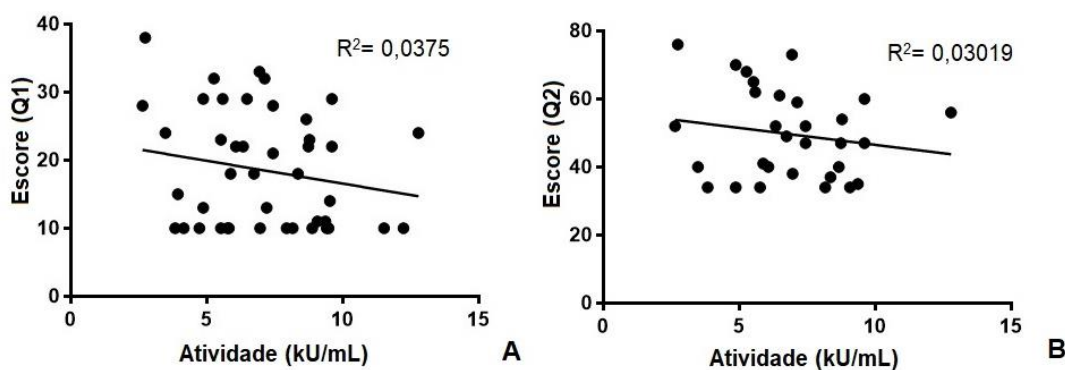
Cristalli e colaboradores (2012), por outro lado, encontraram aumento da atividade de catalase em eritrócitos e leucócitos em pacientes com DA, assim como o estudo de Perrin e colaboradores (1990) com eritrócitos humanos. Torres e colaboradores (2011) também encontraram aumento da atividade de catalase em eritrócitos de pacientes com DA e, segundo estes autores, este aumento pode ser decorrente de um efeito compensatório para a superprodução de peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos.

Como pode ser observado, há divergência em resultados encontrados em diferentes pesquisas. Assim, segundo a meta-análise realizada por Schrag e colaboradores (2013), a presença da DA em humanos não parece provocar alteração significativa na atividade de catalase em eritrócitos.

O que pode justificar resultados tão distintos dentro da literatura é a influência de outros fatores na atividade da enzima em questão. Alguns trabalhos como de Didziapetrie e colaboradores (2014) e Lassed e colaboradores (2017) têm demonstrado redução da atividade de catalase em eritrócitos e no soro sanguíneo em pacientes humanos com câncer de ovário ou próstata. Outros trabalhos também tem mostrado que a dieta pode ser um fator interferente da atividade desta enzima, uma vez que pode influenciar na produção de espécies reativas. O trabalho de Louzada e colaboradores (2013), por exemplo, mostrou que ratas alimentadas com dieta de cafeteria (dieta que apresenta alimentos de consumo humano e que resulta em obesidade pelo aumento do consumo de energia) apresentaram maior atividade de catalase ovariana. Uma vez que há uma grande variedade de rações disponíveis no mercado e que muitos tutores dão aos animais alimentos humanos, as dietas dos animais também podem vir a influenciar a atividade desta e de outras enzimas. Além disso, os animais do presente trabalho podiam apresentar patologias que ainda não fossem de conhecimento de seus tutores, como o próprio câncer que, assim como outras patologias, também pode ter interferido nesta atividade.

Alguns estudos também mostram que alguns compostos como zinco e vitamina E podem interferir na atividade desta enzima no sangue (HAMID et al., 2011; MALHOTRA e DHAWAN, 2008). Entretanto, em outros estudos não houve diferença significativa na atividade de catalase em fígado ou no sangue pela administração de vitaminas como vitamina E e C (PRZEDBORSKI et al., 1996; DURASEVIC et al., 2010).

Foi também avaliada no presente trabalho, a possibilidade da presença de correlação linear entre os escores obtidos nos questionários e a atividade de catalase, como mostra a Figura 5.



**Figura 5:** Relação entre atividade de catalase em sangue total de cães e os questionários 1 (ROFINA et al., 2006) (A) e 2 (SALVIN et al., 2011) (B).  $p > 0,05$  (A);  $p > 0,05$  (B).

Como pode ser observado na Figura 5, não há correlação linear significativa entre a atividade de catalase e os escores obtidos nos dois questionários.

Sugere-se, desta forma, que a catalase não pode vir a ser um biomarcador específico para a DCC, uma vez que sua atividade pode ser influenciada por diversos outros fatores. Entretanto, os resultados aqui obtidos parecem mostrar que o avanço dos estudos sobre catalase e DCC pode vir a trazer uma ferramenta coadjuvante na análise da evolução da doença, no prognóstico e na escolha do tratamento mais adequado.

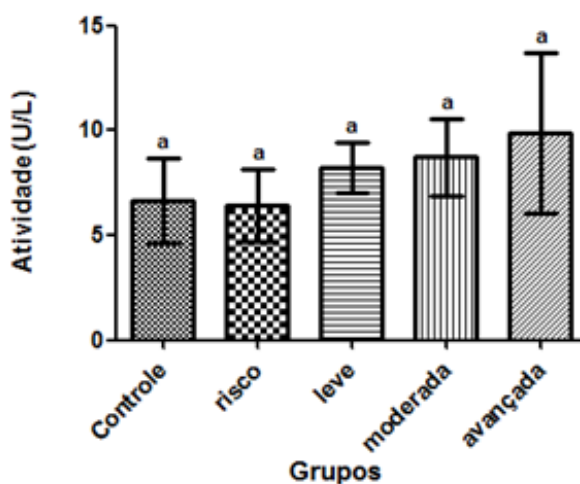
Uma vantagem do uso futuro da catalase como ferramenta coadjuvante no acompanhamento de animais com DCC seria o fato desta enzima ser uma enzima antioxidante e de alguns tratamentos para a patologia se basearem em compostos com ação também antioxidante. Os resultados de Galan e colaboradores (2014) obtidos em seus estudos com cães



da raça Beagle, por exemplo, refletiram uma melhora no metabolismo energético cerebral através do uso de nutracêuticos contendo antioxidantes. Desta forma, o uso adequado desta ferramenta pode vir a contribuir para análise das respostas dos animais aos tratamentos administrados a eles. Para que isso seja possível, entretanto, é necessário novos estudos que avaliem a real influência do tratamento com antioxidantes sobre a atividade sanguínea de catalase em cães, além da influência que a alteração nesta atividade apresenta em relação ao organismo animal.

### 3.2.3 Glutathione S-transferase

Após a padronização do ensaio de GST, foram analisadas as amostras de sangue coletadas dos animais, para observar se há diferença na atividade enzimática entre os cinco grupos formados neste trabalho. O resultado dos ensaios de GST são apresentados na figura 6.



**Figura 6:** Atividade sérica de glutathione S-transferase. Colunas com mesma letra não apresentaram diferença significativa no teste Student-Newman-Keuls (SNK),  $\alpha=0,05$ .

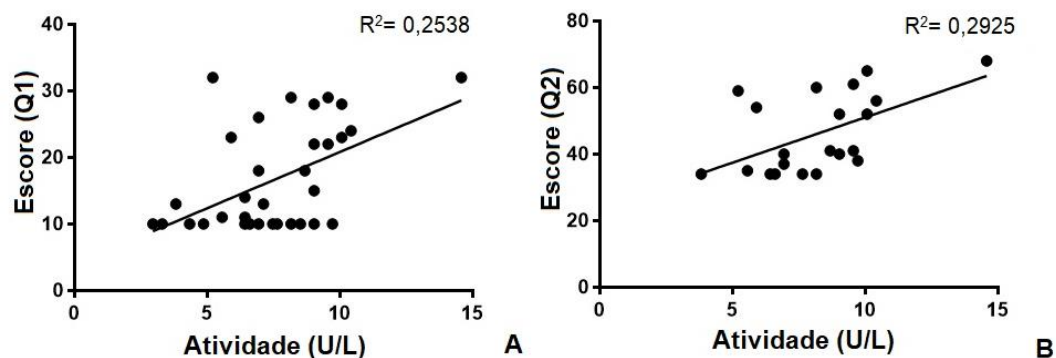
Como pode ser observado na Figura 6, embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos, a atividade enzimática mostrou-se

levemente maior em animais com DCC. Foi possível observar também aumento dos valores das médias nos grupos de animais portadores da Disfunção Cognitiva (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4:** Atividades médias de glutiona S-transferase (GST) (dados retirados da Tabela 2 - Anexo H).

Atividade de GST	Controle (U/L)	Grupo de Risco (U/L)	DCC leve (U/L)	DCC moderada (U/L)	DCC avançada (U/L)
Média	6,66	6,40	8,23	8,72	9,85
Desvio-padrão	2,01	1,72	1,22	1,81	3,83

No presente trabalho também foi analisada a correlação entre a atividade desta enzima e os dois questionários aplicados. Esta correlação é apresentada na Figura 7.



**Figura 7:** Relação entre atividade sérica de glutiona S-transferase e os questionários 1 (ROFINA et al., 2006) (A) e 2 (SALVIN et al., 2011) (B).  $p < 0,05$ ; (A);  $p < 0,05$  (B).

Como pode ser observado na Figura 7, há uma correlação moderada positiva entre a atividade de GST e os escores obtidos nos questionários, segundo a classificação de Monteiro e colaboradores (2014). Entretanto, foi demonstrado não haver diferença significativa entre as

atividades de GST obtidas nos diferentes grupos deste trabalho. Desta forma, sugere-se mais uma vez que estudos que contenham maior número de animais possam vir a mostrar com maior clareza a real influência de diferentes fases da DCC sobre esta enzima e as enzimas avaliadas anteriormente.

Torres e colaboradores (2011) e Cristalli e colaboradores (2012) não encontraram diferença na atividade de GST em eritrócitos na presença da DA. Enquanto isso, Lovell e colaboradores (1998) reportaram diminuição na atividade desta enzima no líquido cefalorraquidiano de pacientes com DA. Os estudos de Liu e colaboradores (2005) mostraram redução do nível de GSH - substrato da GST - em glóbulos vermelhos de pacientes com DA do sexo masculino. Enquanto isso, pacientes do sexo feminino com DA não apresentaram alteração nos níveis de GSH. No trabalho de e colaboradores (2017), houve redução na taxa GSH/GSSG (glutaciona reduzida/glutaciona oxidada) em eritrócitos de pacientes com DA.

No estudo de Cristalli e colaboradores (2012) foi encontrado aumento nas atividades eritrocitárias de glutaciona redutase (GR) e glutaciona peroxidase (GPx) - enzimas que também estão relacionadas ao nível de GSH - na presença da DA. Torres, por outro lado, detectou aumento da GPx e redução da atividade de GR nos eritrócitos de pacientes com DA. Vural e colaboradores (2010) encontraram redução na atividade eritrocitária de GPx. Puertas e colaboradores (2012) encontraram redução na atividade plasmática de GPx em pacientes com DA, ao contrário do aumento encontrado por Zafrilla e colaboradores (2006) no plasma de pacientes com esta doença. Devido às discrepâncias nos resultados encontrados na literatura para estas duas enzimas, a meta-análise de Schrag e colaboradores (2013) levou à conclusão que as atividades em eritrócitos de GPx e GR e a atividade plasmática de GPx não parecem ser alteradas de forma significativa na DA.

Como foi possível observar no presente trabalho, embora não haja diferença significativa entre esta atividade nos cinco diferentes grupos estudados, a presença de uma correlação moderada entre a atividade de GST e os escores obtidos nos questionários faz uma demonstração da possível relação da DCC com alterações em processos que envolvam esta enzima, como o sistema antioxidante e os processos de metabolização.

É importante ressaltar a possibilidade da atividade da GST ser influenciada por outros fatores, como a presença de polimorfismos que, por sua vez, podem ser influenciados pela presença de drogas farmacêuticas, fumaça de cigarro, pesticidas (HOLLMAN et al., 2016). Segundo Linhares e colaboradores (2006), as variações na sequência do DNA podem originar enzimas com atividades variáveis e com diferentes capacidades metabólicas. Além disso,

Allocati e colaboradores (2018) também apontam que diversos membros da família das GSTs foram encontrados superexpressos em diferentes tipos de câncer.

Por fim, é importante destacar que o ensaio de GST utilizado no presente trabalho em amostras de soro apresentou resultados de absorvâncias bastante instáveis, não tendo sido considerado um método de alta confiabilidade. Acredita-se que as análises de GST em líquido cefalorraquidiano ou em eritrócitos isolados possam ser mais apropriadas.

## 4 CONCLUSÃO

Foi possível concluir através deste trabalho que as atividades das colinesterases e da GST em soro e de catalase em sangue total não se mostraram como biomarcadores diagnósticos apropriados para a DCC, uma vez que estatisticamente não houve diferença significativa entre as atividades obtidas nos animais dos cinco diferentes grupos estudados. Entretanto, uma vez que as atividades médias de catalase e das colinesterases mostraram-se alteradas em determinados grupos de animais com DCC ou em risco, acredita-se que um estudo mais detalhado destas enzimas possa vir a ser uma chave para a obtenção de ferramentas de auxílio na avaliação de animais com Disfunção Cognitiva Canina. Sugere-se, portanto, que novos estudos sejam realizados também com o intuito de avaliar as atividades destas enzimas em um mesmo animal em diferentes fases de evolução da DCC e que seja utilizado número maior de animais em futuros trabalhos.

Também foi possível concluir com esta Tese que o estudo da atividade de GST em soro de cães com a metodologia adotada não se mostrou adequado. Uma vez que houve correlação entre os escores obtidos nos questionários e esta atividade enzimática, acredita-se que seja útil um aprofundamento deste estudo utilizando outras metodologias.

É importante destacar que os questionários aqui utilizados mostraram-se de simples utilização e eficazes como ferramenta auxiliadora no diagnóstico da DCC. Desta forma, enquanto não for possível obter uma forma de diagnóstico mais eficaz, acredita-se que o uso combinado dos questionários de Rofina e colaboradores (2006) e Salvin e colaboradores (2011) - aliados a uma análise clínica e neurológica de um médico veterinário - sejam de grande valia.

## **CAPÍTULO II**

### **ESTUDO DE NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA A DCC**

## RESUMO

A Disfunção Cognitiva Canina (DCC) é uma alteração neurodegenerativa de fisiopatologia semelhante à Doença de Alzheimer (DA). Na DCC e na DA ocorre diminuição ou desequilíbrio nos níveis de neurotransmissores como a acetilcolina, substância fundamental para processos como aprendizagem e memória. Assim, este capítulo teve como objetivo avaliar a eficácia de infusões, fitoquímicos e de compostos sintéticos na inibição *in vitro* da acetilcolinesterase (AChE) em cérebro canino através da metodologia proposta por Ellman (1961). Dentre as infusões estudadas, é possível destacar os resultados obtidos com o *Peumus boldus*, que se mostrou eficaz na inibição enzimática e com potencial antioxidante significativo sobre *Saccharomyces cerevisiae*. A quercetina, fitoquímico que segundo a literatura está presente no boldo, foi eficaz na inibição de AChE com uma IC<sub>50</sub> de 0,43 mM. Dentre os compostos sintéticos é possível destacar dois derivados cumarínicos, Cum3 e Cum4. Ambos apresentaram IC<sub>50</sub> de aproximadamente 0,05 µM. Estudos computacionais mostraram interação destes dois compostos com o subsítio esterásico e o sítio aniônio periférico da enzima em *Canis familiaris*. O ensaio sobre *S. cerevisiae* não demonstrou toxicidade de Cum3 sobre estas leveduras. A construção de gráficos de Lineweaver-Burk revelou que estas cumarinas e a quercetina se comportam como inibidores competitivos de AChE cerebral de cães. A infusão de boldo, a quercetina e estas duas cumarinas foram capazes de inibir parcialmente a atividade de BChE, entretanto, os quatro tratamentos se mostraram mais eficazes sobre AChE cerebral. Esta inibição seletiva pode ser importante para limitar possíveis efeitos adversos dos mesmos. Assim, este trabalho apresenta dois compostos sintéticos, um fitoquímico e uma infusão como agentes promissores para pesquisas voltadas para o tratamento da DCC.

**Palavras-chave:** acetilcolinesterase; inibição enzimática; antioxidante.

## ABSTRACT

Canine Cognitive Dysfunction (CCD) is a neurodegenerative disorder of pathophysiology similar to Alzheimer's Disease (AD). In CCD and AD there is a decrease or imbalance in the levels of neurotransmitters such as acetylcholine, a fundamental substance for processes such as learning and memory. The objective of this chapter was to evaluate the efficacy of teas, phytochemicals and synthetic compounds in the *in vitro* inhibition of acetylcholinesterase (AChE) in the canine brain through the methodology proposed by Ellman (1961). Among the teas studied, it is possible to highlight the results obtained with *Peumus boldus*, which proved effective in enzymatic inhibition and with a significant antioxidant potential on *Saccharomyces cerevisiae*. Quercetin, a phytochemical which according to the literature is present in boldo, was effective in inhibiting AChE with an  $IC_{50}$  of 0.43 mM. Among the synthetic compounds it is possible to highlight two coumarin derivatives, Cum3 and Cum4. Both had  $IC_{50}$  of approximately 0.05  $\mu$ M. Computational studies showed interaction of these two compounds with the esteratic subsite and the peripheral anionic site of the enzyme in *Canis familiaris*. The *S. cerevisiae* assay did not demonstrate Cum3 toxicity on these yeasts. The construction of Lineweaver-Burk plots revealed that these coumarins and quercetin behave as competitive inhibitors of cerebral AChE in dogs. Boldo tea, quercetin and these two coumarins were able to partially inhibit BChE activity, however, all four treatments were shown to be more effective on cerebral AChE. This selective inhibition may be important to limit possible adverse effects thereof. Thus, this work presents two synthetic compounds, a phytochemical and a tea as promising agents for research aimed at the treatment of CCD.

**Keywords:** acetylcholinesterase; enzymatic inhibition; antioxidant.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Tratamento de animais com Disfunção Cognitiva Canina

O tratamento da Disfunção Cognitiva Canina, segundo Pineda e colaboradores (2014), deve englobar atividade física, suporte nutricional, enriquecimento ambiental e psicofarmacologia. Snigdha e colaboradores (2016) também apontam a importância das atividades sociais, físicas e cognitivas junto a uma dieta adequada para que se obtenha um envelhecimento cerebral melhor sucedido.

Pesquisas têm mostrado que restrição calórica e uso de antioxidantes, de determinados ácidos graxos, minerais como o selênio, vitaminas E e C, entre outros nutrientes, podem auxiliar a terapia da Disfunção Cognitiva em cães (LANDSBERG, 2006; PINEDA et al., 2014).

Milgram e colaboradores (2004), em um trabalho com cães da raça Beagle, também mostraram a importância da associação de antioxidantes com programas de enriquecimento comportamental e ambiental, como caminhadas e treinamentos.

O primeiro fármaco a ser aprovado para o uso em cães diagnosticados com Disfunção Cognitiva foi a selegilina, que atenua a depleção de neurotransmissão, especialmente da dopamina. Desta forma, este composto melhora a atividade catecolaminérgica e atrasa a progressão da doença neurodegenerativa (TRAVANCINHA, 2014). Segundo Pineda e colaboradores (2014), o uso deste fármaco parece ser a terapia mais eficaz contra a progressão dos sinais clínicos da DCC.

Outros fármacos que podem auxiliar o tratamento da DCC são a propentofilina e a nicergolina, que produzem vasodilatação periférica e melhoram o fluxo sanguíneo cerebral (TRAVANCINHA, 2014, PINEDA et al., 2014).

Fármacos que aumentem o nível de acetilcolina têm demonstrado bons resultados sobre a memória e o desempenho em atividades de cães (LANDSBERG, 2005). Araujo e colaboradores (2011) também mostraram que o uso de inibidores de colinesterase em cães foi capaz de melhorar o aprendizado e a memória de animais idosos.

Fármacos serotoninérgicos, como a clomipramina, podem ser usados em pacientes com ansiedade crônica e alterações nos padrões de sono. A administração deste fármaco em animais geriátricos, entretanto, deve ser cuidadosa. Não é recomendado o seu uso em animais

portadores de doença cardíaca ou renal e, portanto, deve ser feita uma análise do paciente antes do início do tratamento (HEATH, 2002).

Nos animais geriátricos, independente do tratamento adotado e do fármaco selecionado, este deve ser administrado com muito cuidado. Assim, recomenda-se que seja feito um perfil bioquímico e hematológico antes do início de cada tratamento e uma monitoração de 6 em 6 meses durante o mesmo (HEATH, 2002).

Uma vez que não há cura para a DCC e para a DA, o tratamento farmacológico visa estabelecer melhoria na qualidade de vida dos pacientes. Segundo a Portaria Conjunta número 13, de 28/11/17 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), o objetivo do tratamento medicamentoso da DA é propiciar a estabilização do comprometimento cognitivo, do comportamento e da realização das atividades diárias. Dentre os medicamentos utilizados no tratamento da DA pode-se destacar os inibidores de acetilcolinesterase - como donepezila, galantamina e rivastigmina.

Os inibidores de AChE são recomendados para o tratamento da DA leve a moderada, fundamentando-se no aumento da secreção ou no prolongamento da meia-vida da acetilcolina na fenda sináptica em áreas relevantes do cérebro, podendo promover melhoras dos sintomas cognitivos e na função global. Para estágios graves da DA, o antagonista do receptor NMDA - memantina – está indicado, uma vez que a DA também está associada com distúrbios nestes receptores e o uso desta droga tem ocasionado resultados favoráveis na qualidade de vida destes pacientes (BRASIL, 2017).

## **1.2 Uso de anticolinesterásicos na Doença de Alzheimer**

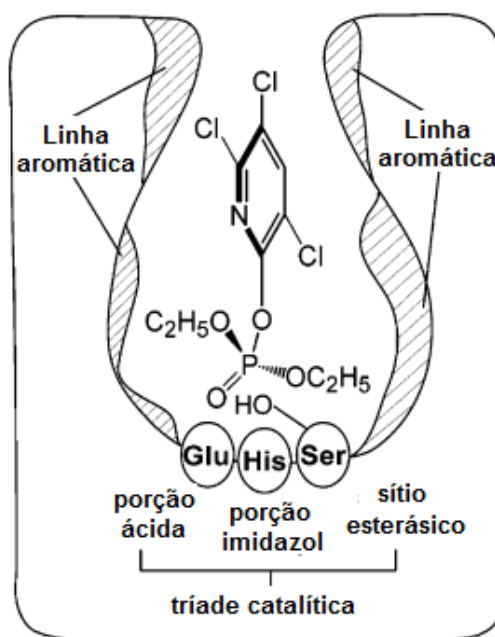
Segundo Chioua e colaboradores (2018), a tacrina foi o primeiro anticolinesterásico aprovado para o tratamento da DA em 1993. Entretanto, em decorrência de sua toxicidade e com a aprovação de drogas menos tóxicas e com programação de posologia facilitada, a tacrina passou a não ser mais utilizada na rotina clínica (LIMA, 2018; MEHTA et al., 2012). Atualmente, é comum a recomendação do uso dos inibidores de AChE donepezila, galantamina e rivastigmina no tratamento da DA (BRASIL, 2017).

Os inibidores de acetilcolinesterase impedem a degradação da acetilcolina, provocando assim uma estimulação aumentada de receptores colinérgicos pós sinápticos no sistema nervoso. A ação dos anticolinesterásicos pode ser considerada como uma proteção

neuronal em doenças caracterizadas por deficiência de neurotransmissão mediada por acetilcolina, como a DA, como apontam Singh e colaboradores (2013). Estes inibidores podem ser divididos em dois grupos: inibidores irreversíveis e inibidores reversíveis.

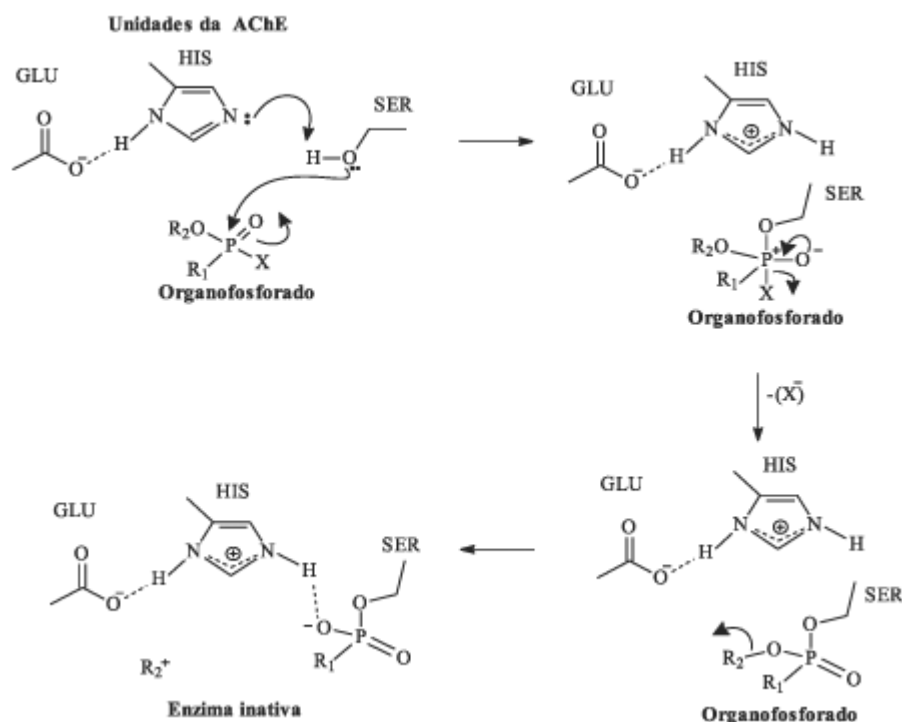
Inibidores reversíveis - competitivos ou não competitivos - são amplamente utilizados com aplicações terapêuticas. Alguns deles, entretanto, também são utilizados com o objetivo de causar toxicidade a organismos específicos como, por exemplo, carbamatos usados como inseticidas. Os inibidores irreversíveis são amplamente empregados como agentes tóxicos; no entanto, também são conhecidas aplicações terapêuticas dos mesmos como, por exemplo, organofosforados usados no tratamento de glaucoma (COLOVIC et al., 2013).

Um exemplo de interação entre acetilcolinesterase e um inibidor organofosforado é apresentado na Figura 1.



**Figura 1:** Representação esquemática da interação de um inibidor de acetilcolinesterase com o sítio ativo da enzima. A tríade catalítica encontra-se no fundo da cavidade estreita e profunda. A formação do derivado dietilfosforil no resíduo de serina envolve a participação da porção imidazol e da porção ácida. O revestimento aromático orienta o inibidor e acaba auxiliando seu posicionamento (adaptado de Casida e Quistad, 2004).

Na presença de organofosforados, o resíduo de serina do sítio ativo é fosforilado. Desta forma, surge uma forte interação entre o resíduo de histidina protonada e o átomo de oxigênio do inibidor, o que prejudica a hidrólise da enzima, necessária para sua reativação (Figura 2) (SANTOS et al., 2007).



**Figura 2:** Mecanismo de inibição de acetilcolinesterase por organofosforado (SANTOS et al. 2007).

Os inibidores de AChE ligam-se ao sítio ativo catalítico ou ao sítio aniônico periférico. Podem ainda abranger os dois sítios ocupando assim a maior parte da cavidade. Os inibidores do PAS limitam a taxa catalítica por bloqueio estérico e eletrostático modificando a conformação do sítio ativo. A maior parte dos ligantes é colocada na base da cavidade hidrofóbica. Os ligantes maiores, entretanto, estendem-se até a abertura da cavidade (ALMEIDA, 2015).

Donepezil é um tipo de inibidor não competitivo de AChE que se liga ao sítio aniônico periférico. Rivastigmina liga-se ao sítio esterásico e galantamina, por sua vez, se liga ao subsítio aniônico e à porção aromática, correspondendo a um inibidor competitivo desta enzima (PILGER et al., 2001; COLOVIC et al., 2013).

Alguns inibidores da acetilcolinesterase também podem inibir a butirilcolinesterase, como a rivastigmina e a tacrina (BONO, 2014; LISTON et al., 2004). Alguns pesquisadores relatam que inibidores seletivos para acetilcolinesterase produzem menos sinais colinérgicos periféricos, ao passo que compostos que inibem as duas colinesterases parecem estar associados com maior incidência de efeitos adversos (LISTON et al., 2004).

Segundo Raza e colaboradores (2012), entretanto, a inibição das duas enzimas é considerada uma estratégia promissora para o tratamento da DA. Nordberg e colaboradores (2013) apontam que tanto os inibidores seletivos de AChE, quanto o inibidor das duas enzimas, demonstram eficácia sintomática na DA.

### **1.3 Uso de outras alternativas de tratamento na Doença de Alzheimer**

A vitamina E (alfa-tocoferol) e a selegilina também têm sido usadas no tratamento da Doença de Alzheimer. Ambas apresentam ação antioxidante, produzindo um desaceleramento do processo de envelhecimento celular, retardando o desenvolvimento da doença (INOUYE e OLIVEIRA, 2004).

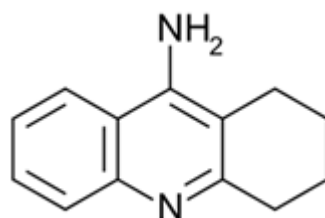
Novas pesquisas têm sido realizadas visando encontrar formas mais eficazes para o tratamento da DA. Algumas se baseiam em alvos já conhecidos como a acetilcolinesterase e os peptídeos  $\beta$ -amilóides, enquanto outras buscam novos alvos que podem vir a ser utilizados futuramente. O trabalho de Hu e colaboradores (2018) mostrou que a deleção gradativa da enzima BACE1 em ratos adultos foi capaz de reverter completamente a deposição amiloide e, assim, melhorar funções cognitivas. Bicca (2016) focou seu trabalho no estudo do receptor de potencial transitório TRPA1 que é reconhecido como mediador de processos de dor e inflamação. A pesquisadora encontrou relação entre o acúmulo de oligômeros  $\beta$ -amilóide e a distribuição de TRPA-1. O tratamento com antagonista seletivo deste receptor acarretou efeito benéfico sobre a perda da memória e mostrou ser um alvo potencial novo para o tratamento da DA.

Diversos estudos recentes têm investigado a possibilidade do uso de Estimulação Cerebral Profunda (Deep Brain Stimulation, DBS) - forma elétrica de neuromodulação historicamente utilizada em distúrbios do movimento - no tratamento da Doença de Alzheimer. Segundo Lee e Lozano (2019), o uso de DBS para o tratamento da DA está em fase nascente e há resultados variados no uso desta estimulação para tal fim. Entretanto, estes autores apontam que essa forma de tratamento apresenta um potencial promissor para uso na Doença de Alzheimer.

#### 1.4 Busca de novos adjuvantes para o tratamento da DCC e da DA

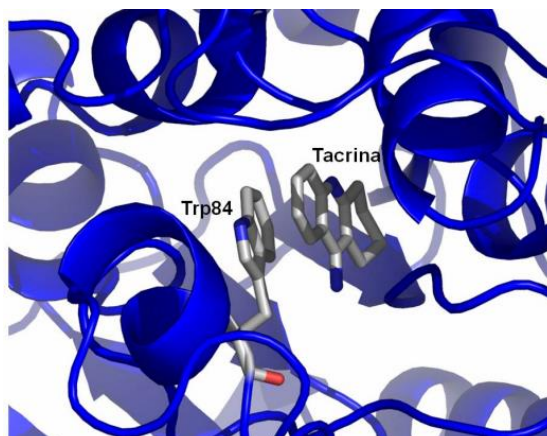
Dentro da perspectiva de estudo de fármacos que tenham alvos já reconhecidos, este trabalho visa avaliar o potencial de compostos naturais e sintéticos como adjuvantes no tratamento da DCC e da DA através do estudo de inibição da acetilcolinesterase em cérebros de cães.

A tacrina (Figura 3) é uma tetraidroacridina e foi a primeira droga utilizada em pacientes com DA. Com ela foram demonstrados os benefícios da reposição colinérgica na Doença de Alzheimer (LIMA, 2008).



**Figura 3:** Estrutura da tacrina

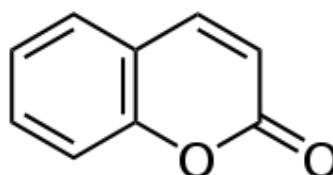
A tacrina estabelece fortes interações com o sítio aniônico da enzima, mas não interage com o sítio periférico (Figura 4) (ALMEIDA, 2011). Segundo Nordberg e Svensson (1998), este fármaco está bastante associado à hepatotoxicidade. Os autores relataram um aumento da atividade de enzimas hepáticas em 49% dos pacientes com DA tratados com tacrina.



**Figura 4:** Interação entre Trp84 (do sítio aniônico da enzima acetilcolinesterase) com a tacrina. Interação entre o anel quinolínico da tacrina e o anel indólico do aminoácido (ALMEIDA, 2011).

Segundo Lopes (2014), análogos dímeros da tacrina, conhecidos como bis-tacrina, têm apresentado potencial anticolinesterásico maior do que a tacrina e seus análogos, devido ao fato de também atuarem no sítio periférico. Com isso, a busca por dímeros e híbridos contendo o núcleo tacrina vêm crescendo nos estudos sobre anticolinesterásicos.

Muitos trabalhos também têm mostrado o efeito de derivados de cumarina (Figura 5) na inibição da acetilcolinesterase, como os estudos de Souza e colaboradores (2016) e Anand e colaboradores (2012). Cumarinas são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico e seus derivados possuem diversos efeitos farmacológicos conhecidos, como anticoagulante e inibidores das monoamina oxidases (MAO) (CHEN et al., 2005; PISANI et al., 2009; FERNANDES, 2016).

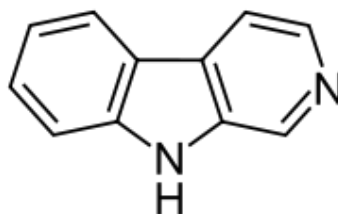


**Figura 5:** Esqueleto básico das cumarinas

Segundo Anand e colaboradores (2012), alguns estudos exploram o modelo da cumarina para síntese de anticolinesterásico também com atividades farmacológicas adicionais, como a diminuição da deposição de A $\beta$ . Piazza e colaboradores (2008), por exemplo, sintetizaram compostos derivados de cumarinas visando uma terapia multi-alvo. Segundo Wu

e colaboradores (2007), os resultados obtidos em seu trabalho sugerem que as cumarinas por eles estudadas, podem ser responsáveis por reversão progressiva de amnésia induzida por escopolamina. E, de acordo com eles, esta reversão pode estar associada à inibição da atividade de AChE e à ativação do sistema neuronal colinérgico.

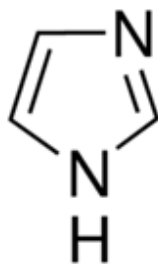
Alguns trabalhos também têm mostrado que os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos também podem atuar como inibidores das colinesterases, como os estudos de Krskova e colaboradores (2011) e Torres e colaboradores (2012). As  $\beta$ -carbolinas (Figura 6) possuem ampla distribuição, sendo encontrados em diferentes plantas, como o maracujá, e em outros locais como fumaça de cigarro. Possuem um núcleo indólico e um anel piridínico. Apresentam diversas ações farmacológicas sobre o sistema nervoso central, podendo provocar alucinações e convulsões (MOURA, 2006). Harmanas são exemplos de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos e, segundo Boeira e colaboradores (2011), podem apresentar efeitos genotóxicos. Apesar disso, os compostos  $\beta$ -carbolínicos têm sido amplamente estudados uma vez que possuem atividades biológicas bastante importantes como imunossupressão e atividade antioxidante (MOURA, 2006).



**Figura 6:** Estrutura de junção do núcleo indólico e do anel piridínico formando os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos.

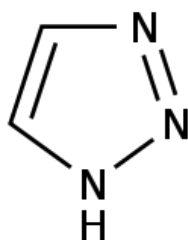
Recentes estudos também têm demonstrado o potencial anticolinesterásico de compostos com núcleo imidazólico (Figura 7). Além disso, estes compostos têm apresentado potencial inibitório sobre a agregação de  $\beta$ -amilóide, sendo destacados como promissores na abordagem da terapia multialvo da DA (LIU et al., 2014; CORNEC et al., 2017).





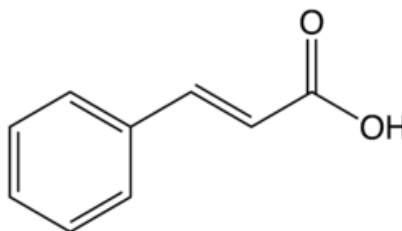
**Figura 7:** Estrutura do imidazol

Os triazóis (Figura 8) formam um grupo químico que também tem sido amplamente estudado para a síntese de compostos para o tratamento de Alzheimer, como foi feito por Mohammadi-Khanaposhtani e colaboradores (2015). Os heterociclos desempenham um papel importante na concepção de novas entidades estruturais para aplicações medicinais uma vez que fazem parte de grupos farmacofóricos, ou seja, as partes das moléculas responsáveis pela atividade biológica (THOMAS et al., 2011; FREITAS, 2014; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).



**Figura 8:** Estrutura básica de um triazol

Outros compostos que estão sendo apontados para futuras estratégias de terapia multialvo são os derivados do ácido cinâmico (Figura 9). Lan e colaboradores (2017) mostraram que derivados deste ácido, além de apresentarem potencial para inibir a atividade de acetilcolinesterase, podem agir como quelantes de íons metálicos.



**Figura 9:** Estrutura do ácido cinâmico

Estudos recentes também apontam que certos açúcares, como a galactose, são capazes de reverter déficits cognitivos (SALKOVIC-PETRISIC et al., 2014).

Tem ocorrido nos últimos anos um aumento do interesse e da procura de tratamentos a base de compostos naturais. Alguns trabalhos já destacaram compostos que possuem efeitos terapêuticos interessantes para um futuro tratamento para doenças neurodegenerativas. Amaral (2011), Pedro (2008) e Raghavendra e colaboradores (2015) mostraram a eficácia dos extratos de boldo chileno, hortelã e de chá verde, respectivamente, em inibir a acetilcolinesterase de linhas celulares humanas e do peixe poraquê. Muitas outras plantas apresentam também constituintes com este efeito anticolinesterásico. Segundo Barbosa-Filho e colaboradores (2006), muitos extratos de plantas testados já mostraram atividade inibitória contra a acetilcolinesterase e poderiam ser considerados para estudos da DA. Segundo os autores, as espécies que pertencem às famílias Amaryllidaceae, Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae e Fumariaceae foram amplamente estudadas.

No trabalho de Toda e colaboradores (2011) foi possível observar que as procianidinas, flavonoides presentes na maçã, são capazes de suprimir a agregação de peptídeos A $\beta$ , o que torna este fruto um alvo também interessante na busca de novos tratamentos para a DA e DCC.

Os resultados positivos obtidos em outrora por outros autores estudando novos tratamentos para a DA, demonstram que os compostos aqui apresentados possuem um alto potencial para uso como adjuvantes no tratamento da DCC. Portanto, este trabalho também tem por objetivo avaliar possíveis efeitos de diferentes compostos sobre esta patologia e sobre a Doença de Alzheimer, uma vez que os cães têm sido descritos como um bom modelo para o estudo desta última doença.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e preparo dos compostos sintéticos e naturais

Compostos derivados da tacrina e da lofina (Compostos 1-5) foram obtidos em colaboração com o Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos da Fundação Oswaldo Cruz. Os compostos cumarínicos (6-16), os compostos triazólicos (17-19), os derivados do ácido cinâmico (20-21), os compostos imidazólicos (22-24) e os derivados de harmana (25-28) foram obtidos em colaboração com o Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal da UFRRJ (LadMol-QM/UFRRJ) coordenado pelo professor Arthur Eugen Kummerle, coorientador deste projeto. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO 0,1%.

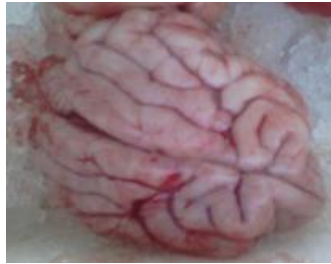
Os seguintes fitoquímicos foram obtidos em colaboração com o Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFRRJ, coordenado pelo professor Mário Geraldo de Carvalho: Rutina (Sigma); Hesperidina (Sigma); Quercetina (Sigma); Alantoína (ACROS); Diosgenina e Tricina – extraídas no próprio laboratório.

As infusões foram preparadas em laboratório através da adição de sachês industrializados em água destilada a 100°C por 10 minutos. A proporção usada foi de 1 g das respectivas folhas, ou casca do fruto, para 50 mL de água. Para este preparo foram utilizadas as folhas de *Mentha piperita* (hortelã – marca Leão Fuze), *Peumus boldus* (boldo – marca Italianinho) e *Cammelia sinensis* (chá verde – marca Italianinho) e o fruto de *Pyrus malus* (maçã – marca Leão Fuze).

### 2.2 Ensaio de acetilcolinesterase

#### 2.2.1 Obtenção de amostras de cérebros de cães

Cérebros de cães sem raça definida (SRD) (Figura 10) com idade igual ou superior a 8 anos, sem histórico de doença neurológica, e que foram a óbito de forma natural, foram obtidos em colaboração com a professora Marilene Farias de Queiroz Brito (UFRRJ) e foram oriundos de necropsias das aulas práticas da disciplina Anatomia Patológica Especial da UFRRJ.



**Figura 10:** Cérebro de cão idoso SRD (sem raça definida) utilizado em ensaios enzimáticos.

### **2.2.2 Homogeneização de cérebros de cães**

Os cérebros foram homogeneizados em homogeneizador mecânico (tipo Potter-Elvehjem) com tampão de ensaio (fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5). Foi utilizado 0,25 g de cérebro/mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi congelado e armazenado para posterior uso.

### **2.2.3 Dosagem de proteína no homogeneizado cerebral**

Para determinação da concentração proteica nos homogeneizados cerebrais foi utilizada a metodologia proposta por Peterson (1977). Albumina sérica bovina (10 e 100  $\mu$ g) foi usada como padrão.

### **2.2.4 Determinação da atividade de acetilcolinesterase**

A presença da atividade acetilcolinesterásica no homogeneizado foi determinada utilizando o método de Ellman (1961) modificado. O homogeneizado foi adicionado aos poços de uma placa de ELISA contendo tampão de ensaio e os compostos a serem analisados. No grupo controle foi utilizado o solvente de dissolução dos compostos. Em todos os poços foi adicionado ácido 5,5' ditionitrobenzeno (DTNB) 0,32 mM dissolvido em tampão e posteriormente foi realizada a primeira leitura espectrofotométrica a 412 nm. Após a leitura foi feita uma incubação a 37°C por 10 minutos. Posteriormente foi adicionado o substrato (iodeto de acetiltiocolina) 1,5 mM, obtendo-se

assim um volume reacional de 220  $\mu\text{L}$ . A seguir fez-se uma nova incubação de 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e posteriormente foi realizada a segunda leitura a 412 nm. Para determinação da atividade enzimática foi utilizada a subtração entre as duas absorvâncias obtidas. O coeficiente de absorvidade molar utilizado foi de  $14,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , como sugerido por Eyer e colaboradores (2003).

### **2.2.5 Determinação de parâmetros cinéticos**

Para determinar os parâmetros  $V_{\text{máx}}$  (velocidade máxima) e  $K_M$  (constante de Michaelis) na presença e na ausência de inibidores, foram utilizadas diferentes concentrações (0,006 a 3 mM) do substrato acetiltiocolina. Para determinação da  $IC_{50}$  (concentração inibitória de 50% da atividade enzimática) foram utilizadas concentração única de acetiltiocolina (1,5 mM) e diferentes concentrações dos inibidores. A atividade da acetilcolinesterase foi então determinada e os valores foram adicionados em gráficos utilizando o programa GraphPad Prism 5. Para determinação de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$  foi construído um gráfico de Lineweaver-Burk para cada inibidor. As constantes de inibição ( $K_i$ ) foram determinadas através do programa GraphPad Prism 5.

## **2.3 Ensaio de butirilcolinesterase**

### **2.3.1 Obtenção de amostras de sangue**

Amostras de sangue de cães com idade igual ou superior a 8 anos sem sintomatologia de disfunção neurológica foram obtidas através da concordância de seus respectivos tutores. As amostras foram acondicionadas em tubos do tipo Vacutainer® sem anticoagulante para posterior obtenção do soro.

### **2.3.2 Preparo de soro sanguíneo**

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos para obtenção do soro. O soro foi diluído com o tampão de ensaio fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 (diluição 1:10).

### **2.3.3 Determinação da atividade de butirilcolinesterase**

A presença da atividade de BChE também foi determinada utilizando o método de Ellman (1961) modificado. O soro diluído foi adicionado aos poços de uma placa de ELISA contendo tampão de ensaio e os compostos a serem analisados. No grupo controle foi utilizado o solvente de dissolução dos compostos. Em todos os poços foi adicionado DTNB 0,32 mM dissolvido em tampão e posteriormente foi feita a primeira leitura espectrofotométrica a 412 nm. Após a leitura foi feita uma incubação a 37°C por 10 minutos. A seguir foi adicionado o substrato (iodeto de butiriltiocolina) 1,5 mM, obtendo-se assim um volume reacional de 220 µL. A seguir fez-se uma nova incubação de 10 minutos a 37°C e posteriormente foi feita a segunda leitura a 412 nm. Para determinação da atividade enzimática foi utilizada a subtração entre as duas absorvâncias obtidas. O coeficiente de absorvidade molar utilizado foi de  $14,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , como sugerido por Eyer e colaboradores (2003).

### **2.4 Ensaio em levedura**

Os ensaios em *Saccharomyces cerevisiae* foram realizados em colaboração com o Laboratório de Estresse Oxidativo em Microorganismos coordenado pelo professor Cristiano Jorge Riger da UFRRJ. Para estes ensaios, foi utilizada a cepa BY4741 (MATa; his3; leu2; met15; ura3). As leveduras foram mantidas em meio de cultura sólido YPD 2% (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar).

Para o ensaio de avaliação da toxicidade do composto cumarínico Cum3 foram utilizadas as concentrações de 10 e 100 µM. Para análise do potencial antioxidante das infusões na presença de peróxido de hidrogênio 1 mM foi utilizado volume de 50 µl de cada infusão em um meio contendo 10 mL de volume final. Para os ensaios e posterior determinação do número de células viáveis foi utilizada a metodologia descrita por Ferreira e colaboradores (2016).

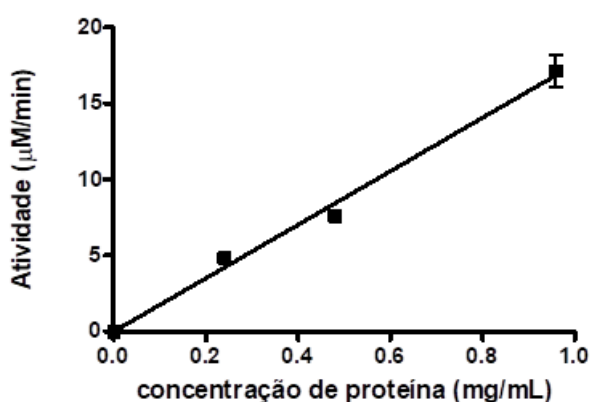
## **2.5 Análise estatística**

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para comparação individual entre dois grupos foi utilizado o Teste t de student. Para comparação entre mais grupos utilizou-se o Teste Student-Newman-Keuls (SNK) ou Teste de Tukey. Para os testes estatísticos foi considerado o nível de significância de 5%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Atividade de acetilcolinesterase *versus* concentração proteica

Inicialmente foi construída uma curva de concentração de proteína *versus* atividade de AChE, visando identificar uma concentração adequada para os posteriores ensaios com os inibidores. Esta curva é apresentada na Figura 11.



**Figura 11:** Curva de concentração de proteína *versus* atividade de acetilcolinesterase em homogeneizado de cérebro canino.

Através da análise da curva da Figura 11, foi definida a concentração proteica de 0,24 mg/mL para os ensaios de inibição. Como pode ser observado, o ponto referente a esta concentração se encontra bastante próximo à linha de tendência e possibilita um nível de atividade enzimática significativa. Além disso, valores mais altos de concentração proteica poderiam prejudicar o ensaio enzimático por promoverem valores mais altos de absorvância em decorrência do maior volume de homogeneizado.

#### 3.2 Efeito de compostos naturais sobre acetilcolinesterase cerebral

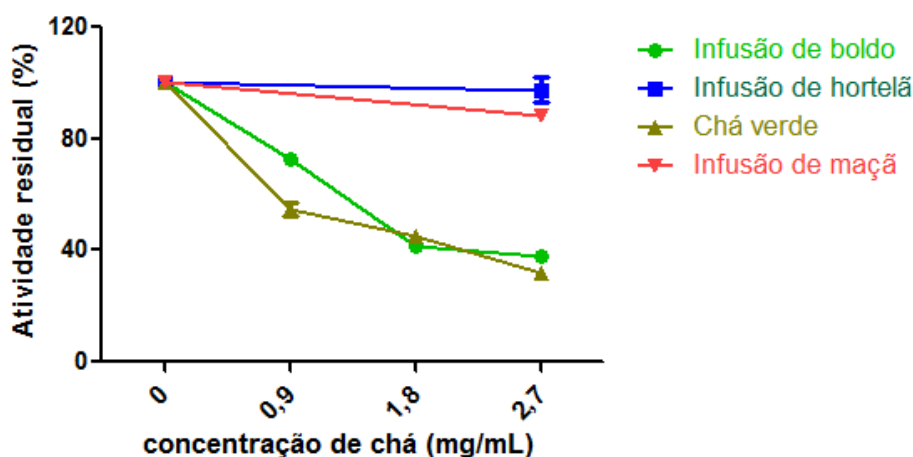
##### 3.2.1 Infusões

A busca de compostos terapêuticos naturais de fácil acesso e de baixo custo é de grande relevância na área da Saúde, sobretudo na área da Medicina Veterinária. Desta forma,



este trabalho buscou avaliar inicialmente os efeitos *in vitro* de infusões sobre a atividade da AChE em cérebro de cães.

Assim, selecionou-se 4 infusões comerciais bastante comuns no Brasil: chá verde, infusão de hortelã, infusão de boldo e infusão de maçã. O efeito *in vitro* destes compostos sobre a atividade de AChE pode ser observado na Figura 12.



**Figura 12:** Efeito de infusões sobre a atividade de acetilcolinesterase em homogeneizado de cérebro canino.

A partir da análise da Figura 12 pôde-se observar que as infusões que inibem de forma mais expressiva a atividade enzimática de AChE são o chá de boldo e o chá verde. Segundo o Teste t de Student ( $\alpha=0,05$ ), o chá de maçã também foi capaz de inibir de forma significativa a atividade de AChE, embora de forma menos expressiva. Não houve diferença significativa entre as inibições provocadas pelo chá de boldo e pelo chá verde. Com isso, estas infusões passaram a representar os principais compostos desta parte do trabalho.

Segundo nossos resultados, para inibir 50% da atividade *in vitro* de AChE em cérebro canino foi necessária uma concentração de 1,9 mg/mL de chá de boldo; aproximadamente o dobro da concentração necessária para inibir AChE de *Electrophorus electricus* utilizando extrato de folhas frescas segundo Falé e colaboradores (2012). No caso do chá verde, nossos resultados indicaram a necessidade de 1,7 mg/mL de concentração de chá para inibição de 50% da atividade, concentração também mais alta do que as apresentadas na literatura onde fez-se uso de extratos sobre o *E. electricus* (JAZAYERI et al., 2014; RAGHAVENDRA et al., 2015).

Esta diferença pode ser decorrente da presença de resíduos distintos de aminoácidos do sítio ativo de AChE em *E. electricus* e em cães fazendo interação com componentes destas infusões. Além disso, como foi demonstrado nos estudos de Nishiwama e colaboradores (2010) com chá verde, a forma de preparo e de acondicionamento e o tempo de infusão influenciam bastante nas atividades biológicas do chá e no teor dos compostos bioativos.

O potencial antioxidante destes quatro chás foi analisado no Laboratório de Estresse Oxidativo em Microorganismos da UFRRJ. Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio - como agente oxidativo - foi utilizado com a intenção de provocar estresse no meio de cultura, levando algumas células à morte. O resultado é apresentado na Figura 13.

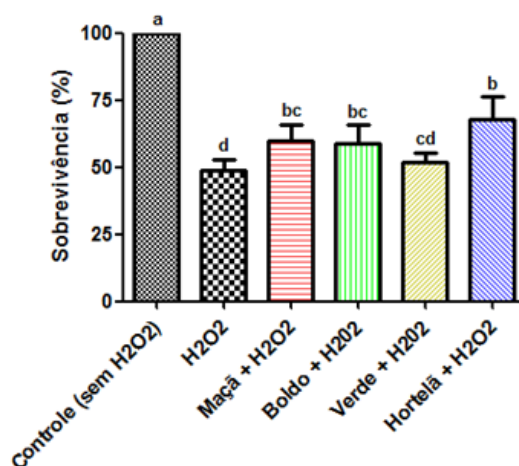


Figura 13: Potencial antioxidante de infusões (0,5%) na presença de peróxido de hidrogênio (0,01%) em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Colunas com mesma letra não apresentaram diferença significativa no Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ .

Como pode ser observado na Figura 13, ao utilizar o peróxido de hidrogênio, há uma redução de aproximadamente 50% no número de células. O uso das infusões de maçã, boldo e hortelã ofereceram certo nível de proteção ao meio de cultura, aumentando a sobrevivência de *S. cerevisiae*. O chá verde não foi capaz de oferecer esta proteção, visto que não houve diferença significativa entre a sobrevivência obtida entre o grupo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sem infusões (segunda coluna) e o grupo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com chá verde (quinta coluna).

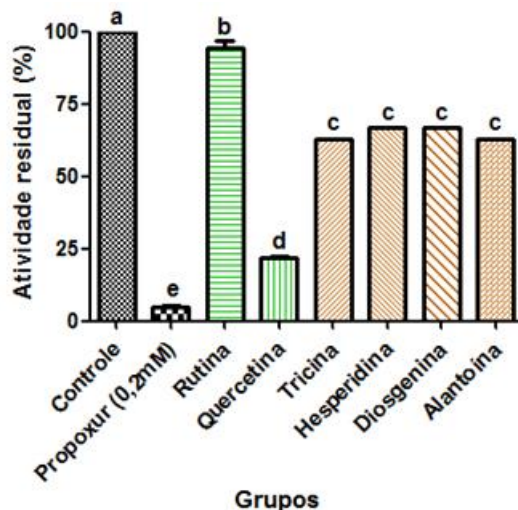
O fato do chá verde não ter apresentado eficácia como agente antioxidante, somado aos resultados de Kapetanovic e colaboradores (2009) que demonstraram que o uso crônico deste chá provoca alta toxicidade em cães, fez com que a infusão de boldo se apresentasse como a infusão mais relevante deste trabalho. Além disso, *Peumus boldus* é uma planta que já está

presente na composição de medicamentos veterinários de uso oral para cães, como Anibio Pankrea Vital e Naturovita Pet, ambos indicados para problemas digestivos, entre outras disfunções. Tem sido demonstrada também a eficácia desta planta combinada com *Spiraea ulmaria* no controle bacteriano em cães atópicos (SANTORO et al., 2018). Esta planta também apresenta constituintes que possuem uso terapêutico já consolidado na medicina veterinária, como a rutina (FOSSUM, 2008) e a quercetina (BROADFOOT et al., 2009), o que aumenta ainda mais a perspectiva dos estudos com esta infusão.

### 3.2.2 Fitoquímicos isolados

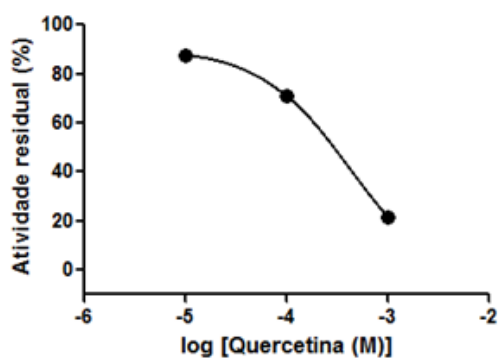
Os primeiros fitoquímicos estudados no presente trabalho foram dois flavonoides presentes no boldo: quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) e rutina (quercetina 3-rutinosídeo) (CAMATTI-SARTORI et al., 2013; MATSUBARA & RODRIGUEZ-AMAYA, 2006).

Enquanto a quercetina se mostrou eficaz na inibição *in vitro* da atividade de AChE em cães, a rutina não foi capaz de inibir esta enzima de forma significativa. Resultado semelhante foi encontrado por Khan e colaboradores (2009) utilizando *E. electricus*. Além destes flavonoides, foram selecionados outros fitoquímicos para um screening na busca de novas moléculas naturais capazes de inibir de forma significativa a enzima AChE em cérebro de cão (Figura 14). Para esta análise foi utilizado o propoxur a 0,2 mM como inibidor conhecido de AChE (controle positivo) que teve uma inibição semelhante à apresentada na literatura (WEILL et al., 2004).



**Figura 14:** Efeito de fitoquímicos a 1 mM sobre a atividade de acetilcolinesterase em homogeneizado de cérebro canino. Colunas com mesma letra não apresentaram diferença significativa no Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ .

Como pode ser observado na Figura 14, foi utilizada uma concentração relativamente alta dos fitoquímicos (1 mM), e somente a quercetina foi capaz de inibir mais de 50% da atividade enzimática nestas condições. Desta forma, esta substância foi o fitoquímico selecionado para a construção de uma curva de determinação da  $IC_{50}$  (concentração de inibidor responsável pela inibição de 50% da atividade enzimática) (Figura 15).



**Figura 15:** Curva de inibição da atividade de acetilcolinesterase cerebral através do uso de quercetina.

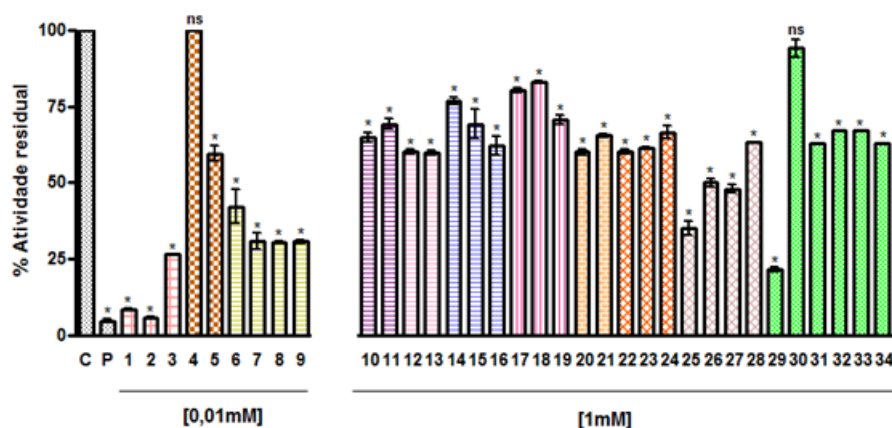
A  $IC_{50}$  de quercetina (0,43 mM ( $\pm 0,14$ )) obtida neste trabalho (Figura 15) foi semelhante a encontrada por Khan e colaboradores (2009) em seu estudo com *E. electricus*, onde o autor classificou este flavonoide como um inibidor competitivo de AChE. Estudos computacionais apresentados na literatura têm mostrado interações importantes entre a quercetina e aminoácidos do sítios aniônio e do PAS. Apesar da quercetina ter apresentado uma

IC<sub>50</sub> relativamente alta, ela pode ser classificada como uma inibidora ativa de acetilcolinesterase segundo a classificação de Wink (2000).

De acordo com a literatura, a quercetina tem mostrado ser capaz de fornecer benefícios para processos cognitivos como de aprendizagem e memória. Isto foi demonstrado em camundongos no trabalho de Wang e colaboradores (2014). Os estudos de Maria e colaboradores (2015) também mostraram que este flavonóide foi capaz de melhorar o desempenho em tarefas de aprendizagem e memória espacial, sugerindo ser capaz de reverter características histológicas da Doença de Alzheimer e proteger a função cognitiva em camundongos.

### **3.3 Efeito de compostos sintéticos sobre acetilcolinesterase cerebral**

Inicialmente foi realizado um screening com compostos de 10 diferentes séries de síntese, com o objetivo de selecionar aqueles com melhor potencial anticolinesterásico. O resultado deste screening é apresentado na Figura 16. As estruturas de todos estes compostos são apresentadas no Anexo I.



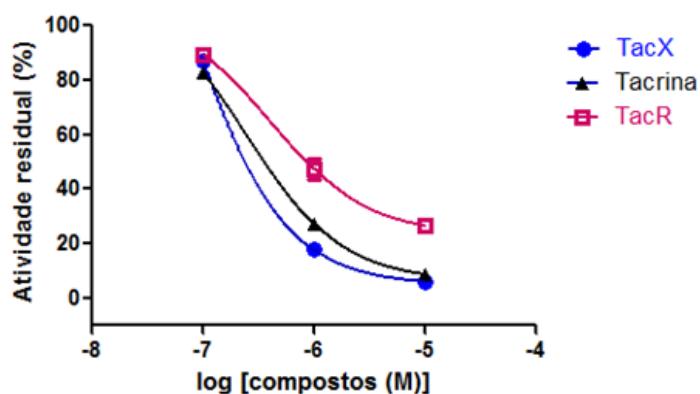
**Figura 16:** Efeito de compostos sintéticos e fitoquímicos em cérebro canino a 0,01 mM (compostos de 1 a 9) e a 1 mM (compostos de 10 a 34). C: Controle. P: Controle positivo de inibição (propoxur a 0,2 mM). 1- Tacrina. Derivados da tacrina: 2- TacX (baseada na tacrina com inserção de xilose); 3- TacR (baseada na tacrina com inserção de ribose). Derivados da lofina: 4- LofX (baseada na lofina com inserção de xilose); 5- LofR (baseada na lofina com inserção de ribose). Série I de derivados da cumarina: 6- Cum1; 7- Cum2; 8- Cum3; 9- Cum4. Série II de derivados da cumarina: 10- Cum1i; 11- Cum2i. Série III de derivados da cumarina: 12- Cum1ii; 13- Cum2ii. Série IV de derivados da cumarina: 14- Cum1iii; 15- Cum2iii; 16- Cum3iii. Derivados de triazóis: 17- Tr1; 18- Tr2; 19- Tr3. Derivados do ácido cinâmico: 20- Ac1; 21- Ac2. Imidazolinias: 22- Im1; 23- Im2; 24- Im3. Derivados de harmana: 25- Har1; 26- Har2; 27- Har3; 28- Har4. Fitoquímicos: 29- quercetina; 30- rutina; 31- tricina; 32- hesperidina; 33- diosgenina; 34- alantoina. Colunas com mesma cor e mesmo desenho interno pertencem à mesma série, exceto as barras correspondentes aos compostos fitoquímicos referenciados com números de 29 a 34. Barras com mesmo desenho interno derivam de um mesmo composto-base, exceto as barras correspondentes aos fitoquímicos. \*Diferença significativa em relação ao C (controle). ns: não é significativa a diferença em relação ao C (controle). Teste de Tukey,  $\alpha=0,05$ .

O composto 1 consiste na molécula de tacrina purificada. Os compostos 2 e 3 referem-se à tacrina conjugada com pentoses, ao passo que os compostos 4 e 5 referem-se à lofina (composto imidazólico) conjugada com as mesmas pentoses (xilose e ribose, respectivamente). Os compostos de 6 a 16 consistem em 4 diferentes séries de compostos cumarínicos. Os compostos 17 a 19 são triazóis. Os compostos 20 e 21 derivam do ácido cinâmico. Os compostos 22 a 24 referem-se a compostos imidazólicos. Os compostos 25 a 28 são compostos  $\beta$ -carbolínicos, mais precisamente compostos derivados de harmana. Na Figura 16 é apresentado também novamente os fitoquímicos (29 a 34) da Figura 14 como forma de facilitar a comparação entre os diferentes tipos de tratamento analisados.

Como pode ser observado na Figura 16, as séries referentes aos compostos derivados da tacrina (1 a 3) e aos compostos cumarínicos da série I (6 a 9) se destacaram como mais eficazes na inibição *in vitro* de acetilcolinesterase cerebral em cães. Desta forma, estas duas séries, bem como a série das harmanas (25 a 28) – que também apresentou certo destaque nesta inibição - foram selecionadas para a construção de curvas de determinação de  $IC_{50}$ .

### 3.3.1 Série das tacrinas

A curva de determinação da  $IC_{50}$  da tacrina e dos seus dois derivados é apresentada na Figura 17 e os valores da  $IC_{50}$  são apresentados na Tabela 1.



**Figura 17:** Curva de inibição da atividade de acetilcolinesterase cerebral através do uso dos compostos da série das tacrinas.

**Tabela 1:** Valores de  $IC_{50}$  obtidos pelos compostos da série das tacrinas

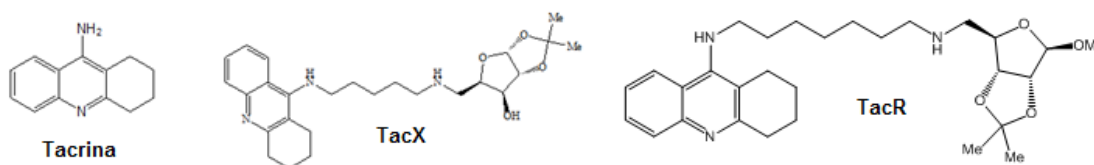
Compostos	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
TacX	0,395 ( $\pm$ 0,24)
Tacrina	0,341 ( $\pm$ 0,08)
TacR	0,586 ( $\pm$ 0,19)

O composto TacX apresentou um potencial inibitório bastante expressivo, mas bastante semelhante ao composto-base (tacrina). Ao avaliar o gráfico da Figura 17, TacX parece ser levemente mais eficaz do que seu composto-base. Ao calcular a  $IC_{50}$  no programa GraphPad Prism 5, não há diferença significativa entre os dois compostos, como mostra a Tabela 1. Desta forma, é possível observar que a estrutura da TacX não foi capaz de melhorar a eficácia da inibição de tacrina em acetilcolinesterase cerebral de cães.

O composto TacR apresentou um valor de  $IC_{50}$  mais elevado (Tabela 1), mas a diferença também não apresenta diferença estatisticamente significativa. O fato de TacR

possuir maior número de carbonos espaçadores e um número maior de metilas periféricas, como mostra a Figura 18, pode ter dificultado um pouco a interação enzima-inibidor. Entretanto, para confirmar esta hipótese, é necessário um estudo computacional mostrando a interação entre estes compostos e o sítio ativo da enzima.

Uma vez que nenhum destes novos compostos mostrou-se com eficácia significativamente superior ao composto-base, e levando-se em consideração a toxicidade da tacrina, esta série foi eliminada do nosso estudo.



**Figura 18:** Estrutura dos compostos da série das tacrinas.

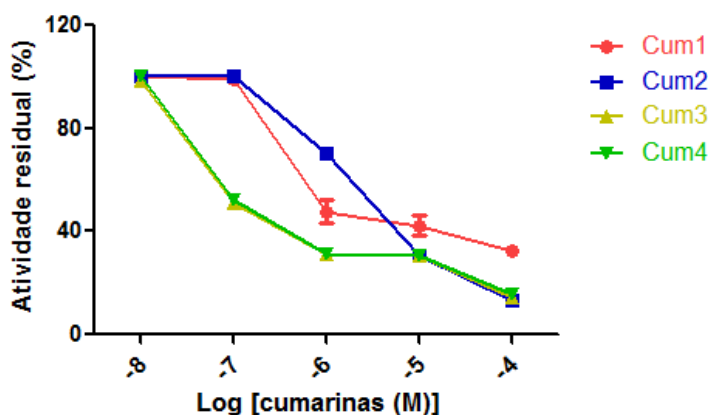
De acordo com a literatura, a tacrina interage com o sítio aniônico da enzima. Alguns compostos que possuem a tacrina como base podem interagir com este sítio e interagir ainda com o PAS, como é o caso da bis-tacrina (ALMEIDA, 2011; LOPES, 2014). Como foi possível notar no presente estudo, apesar dos compostos TacX e TacR apresentarem uma estrutura significativamente maior do que a tacrina, eles não apresentaram uma eficácia aumentada.

O valor de  $IC_{50}$  da tacrina ( $0,341 \mu\text{M}$ ) no cérebro canino em nosso trabalho apresentou um valor próximo à  $IC_{50}$  obtida por Rydberg e colaboradores (2006) com cérebro de rato ( $0,223 \mu\text{M}$ ), por Dgachi e colaboradores (2016) com AChE humana ( $0,131 \mu\text{M}$ ) e por Rakonczay (2003) também com AChE humana ( $0,45 \mu\text{M}$ ). Segundo dados da literatura, a tacrina pode ser classificada como um inibidor não competitivo da acetilcolinesterase (MARKIS, 1990).

### 3.3.2 Série I das cumarinas



Os compostos da primeira série de cumarinas foram eficazes na inibição da acetilcolinesterase cerebral em cães. Assim, foi construída uma curva de determinação da IC<sub>50</sub> destes quatro compostos (Figura 19). Os respectivos valores de IC<sub>50</sub> são apresentados na Tabela 2.



**Figura 19:** Curva de inibição da atividade de acetilcolinesterase cerebral através do uso dos compostos da série I das cumarinas.

**Tabela 2:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos pelos compostos da série I das cumarinas.

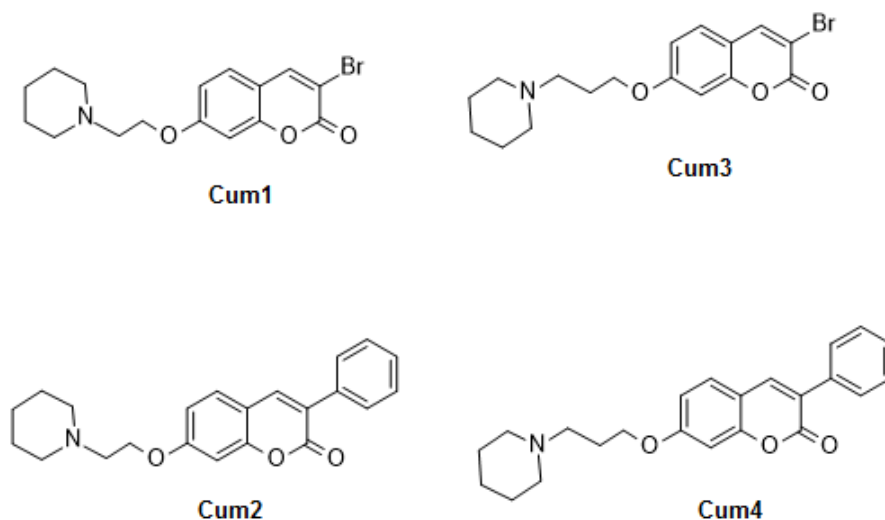
Cumarinas	IC <sub>50</sub> (μM)
Cum1	0.676 (±0,44)
Cum2	2.168 (±0,67)
Cum3	0.063 (±0,04)
Cum4	0.059 (±0,03)

Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos com os compostos Cum3 e Cum4 desta série foram menores que os valores obtidos por alguns compostos comerciais em acetilcolinesterase de cérebro humano por Rakonczay (2003): rivastigmina (4,76 μM), tacrina (0,45 μM), galantamina (5 μM) e donepezila (0,323 μM); e mais altos que compostos como a bis-tacrina (0,0286 nM). Yao e colaboradores (2016) estudando outros derivados cumarínicos encontraram IC<sub>50</sub> de 0,034 μM, semelhante à IC<sub>50</sub> dos compostos Cum3 e Cum4.

Ao comparar os valores de IC<sub>50</sub> dos quatro compostos da presente série, é possível observar que Cum3 e Cum4 (3-bromo-7-((3-piperidin-1-il)propoxi)-cumarina e 3-fenil-7-((3-piperidin-1-il)propoxi)-cumarina, respectivamente) apresentaram maior potencial inibitório

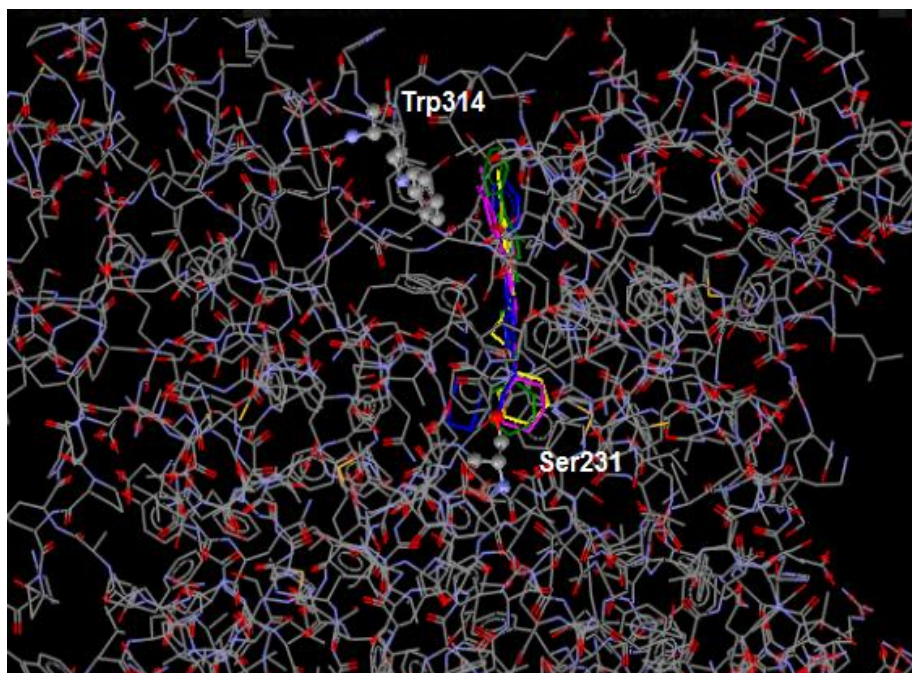
que os outros dois compostos (Cum1 e Cum 2, respectivamente 3-bromo-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina e 3-fenil-7-((2-piperidin-1-il)etoxi)-cumarina). É importante destacar, entretanto, que na presença das maiores concentrações utilizadas, Cum2 apresentou potencial de inibição equivalente à Cum3 e Cum4 (Figura 19).

Como pode ser observado na Figura 20, os compostos Cum3 e Cum4 apresentam um carbono espaçador a mais. Este aumento na estrutura da molécula parece ter favorecido a interação com os resíduos de aminoácidos da enzima. Segundo Raza e colaboradores (2012), os compostos cumarínicos estudados em sua pesquisa poderiam fazer interação primária com o sítio ativo e interação secundária com o PAS, atuando como inibidores competitivos. Segundo o docking feito com um composto cumarínico de Ghanei-Nasab e colaboradores (2016), esta molécula também foi capaz de interagir com resíduos de aminoácidos do PAS. A interação de compostos cumarínicos com o sítio periférico também foi demonstrada por Radic e colaboradores (1991).



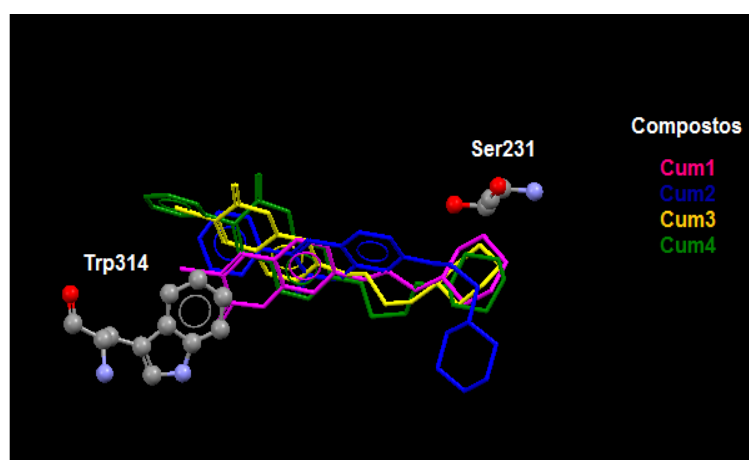
**Figura 20:** Estrutura dos compostos da série I das cumarinas.

De modo a analisar as interações entre os compostos e os sítios da enzima, foi realizado um estudo computacional em colaboração com o Laboratório de Modelagem Molecular da UFRRJ. Estas interações são apresentadas nas Figura 21 e 22.



**Figura 21:** Interação entre os compostos da série I das cumarinas e os aminoácidos do sítio ativo de acetilcolinesterase da espécie *Canis familiaris*. Cum1 é representada pela cor rosa. Cum2 é representada pela cor azul. Cum3 é representada pela cor amarela. Cum4 é representada pela cor verde. Trp314 (correspondente ao resíduo Trp279 do PAS de *T. californica*). Ser231 (correspondente ao resíduo Ser200 da tríade catalítica de *T. californica*).

Como pode ser observado na Figura 21, os compostos interagem com os resíduos Trp314 (correspondente ao resíduo Trp279 do PAS de *T. californica*) e Ser231 (correspondente ao resíduo Ser200 da tríade catalítica de *T. californica*). A Figura 22 apresenta estas interações de forma mais minuciosa.



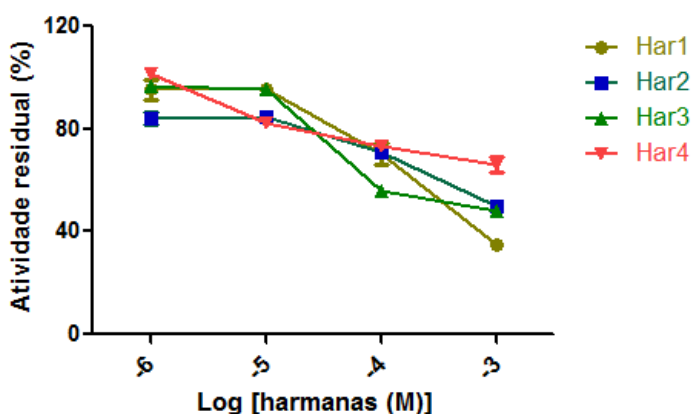
**Figura 22:** Interação entre os compostos da série I das cumarinas e os aminoácidos do sítio ativo de acetilcolinesterase da espécie *Canis familiaris* em imagem mais aproximada. Trp314 (correspondente ao resíduo Trp279 do PAS de *T. californica*). Ser231 (correspondente ao resíduo Ser200 da tríade catalítica de *T. californica*).

Como pode ser observado na Figura 22, a porção aromática dos compostos interage com o PAS, ao passo que a porção que contém o substituinte piperidinilalcoxi adentra o sítio ativo da enzima interagindo com a serina 231. Pode-se observar também que o heterociclo nitrogenado da Cum2 é o que se encontra mais afastado do resíduo de serina do sítio ativo, o que ajuda a justificar seu maior valor de IC<sub>50</sub>.

A interação do inibidor donepezila com o PAS é semelhante à que ocorre com estes compostos cumarínicos, uma vez que tal inibidor comercial faz interação importante com o Trp279 (resíduo de correspondência ao Trp314 de *Canis familiaris*) (MOHAMMADI-FARANI et al., 2013; ALMEIDA, 2011). Por outro lado, o composto comercial tacrina não interage com o sítio periférico, mas faz fortes interações com o sítio aniônico da enzima. Rivastigmina liga-se ao sítio esterásico e galantamina, por sua vez, se estende ao longo do sítio ativo da enzima a partir do subsítio aniônico para o PAS (ALMEIDA, 2011; COLOVIC et al., 2013; PILGER et al., 2001).

### 3.3.3 Série das harmanas

A série das harmanas, embora não tenha sido tão eficaz quanto às duas séries descritas anteriormente, também apresentou um bom potencial anticolinesterásico. A curva de determinação da IC<sub>50</sub> dos compostos é apresentada na Figura 23. A Tabela 3 apresenta os valores de IC<sub>50</sub>.

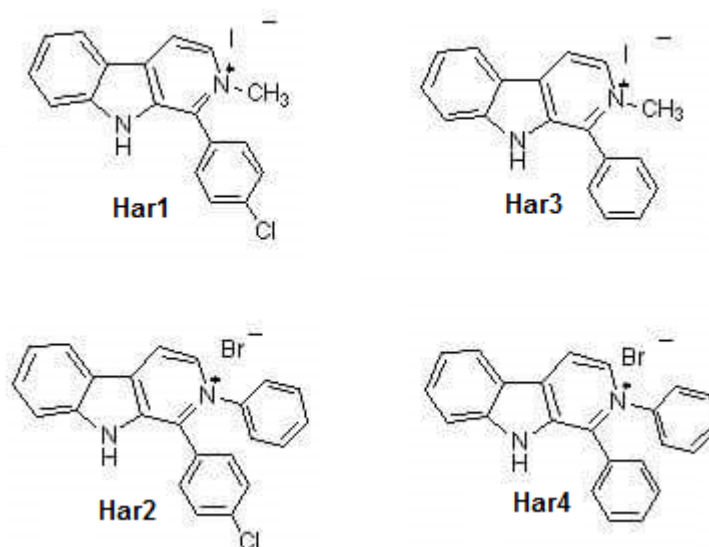


**Figura 23:** Curva de inibição da atividade de acetilcolinesterase cerebral através do uso dos compostos da série das harmanas.

**Tabela 3:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos pelos compostos da série das harmanas.

Harmanas	IC <sub>50</sub> (mM)
Har1	0.129 (±0,08)
Har2	0.119 (±0,02)
Har3	0.037 (±0,02)
Har4	ND

Como pode ser observado na Figura 23 e na Tabela 3, o composto Har3 foi o que apresentou o menor valor de IC<sub>50</sub>. Enquanto isso, o composto Har4 foi o menos eficaz dos quatro compostos da presente série, mesmo apresentando bastante semelhança estrutural com Har3. Isto mostra que provavelmente a presença do radical metila – em Har3 - ligado ao N piridínico favoreceu a interação com resíduos de aminoácidos da enzima em comparação com o radical benzila – em Cum4 - neste mesmo N, como mostra a Figura 24. Os compostos Har1 e Har2, ambos com inserção de um halogênio em um anel aromático, apresentaram resultados semelhantes entre si. Os halogênios são considerados substituintes desativadores para o anel aromático. O cloro pode ter sido responsável por tornar a molécula mais apolar, modificando a interação entre enzima e inibidor, uma vez que há grande lipofilicidade na cavidade da enzima, como aponta Almeida (2015). Entretanto, para uma análise mais profunda sobre tais interações faz-se necessário um estudo computacional com estes compostos e a enzima.



**Figura 24:** Estruturas de compostos da série das harmanas.

Segundo Ghosal e colaboradores (1972), alguns compostos  $\beta$ -carbolínicos podem atuar em apenas um sítio da acetilcolinesterase, enquanto outros podem atuar nos sítios aniônico e esterásico juntamente. Os compostos harmânicos  $\beta$ -carbolínicos estudados por Torres e colaboradores (2012) e classificados como inibidores não competitivos de AChE, mostraram haver uma interação entre eles e os resíduos de Trp84, Phe330 e His440.

### **3.4 Ensaios realizados com os compostos que apresentaram maior eficácia**

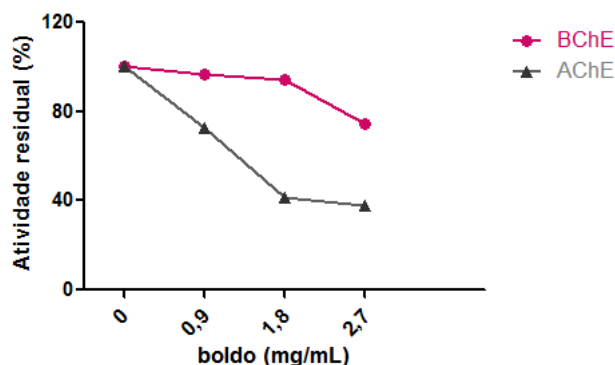
Para dar continuidade a este trabalho, foram selecionados quatro tratamentos. Dentre os compostos sintéticos, selecionou-se os compostos Cum3 e Cum4, uma vez que foram os compostos com menor valor de IC<sub>50</sub>. Dentre os fitoquímicos, a quercetina apresentou maior potencial anticolinesterásico, sendo por isso também selecionada para as próximas etapas deste trabalho. Dentre as infusões, foi selecionado o boldo devido ao seu alto potencial anticolinesterásico e seu potencial antioxidante significativo.

Desta forma, o efeito inibitório destes tratamentos sobre a butirilcolinesterase sanguínea em cães foi avaliado. Os resultados são apresentados a seguir.

#### **3.4.1 Efeito de compostos sobre butirilcolinesterase sérica**

Para comparação entre os efeitos inibitórios sobre AChE cerebral e BChE sanguínea, ambos resultados são apresentados nas figuras 25 e 26.

A Figura 25 apresenta o resultado do efeito da infusão de boldo sobre estas enzimas.

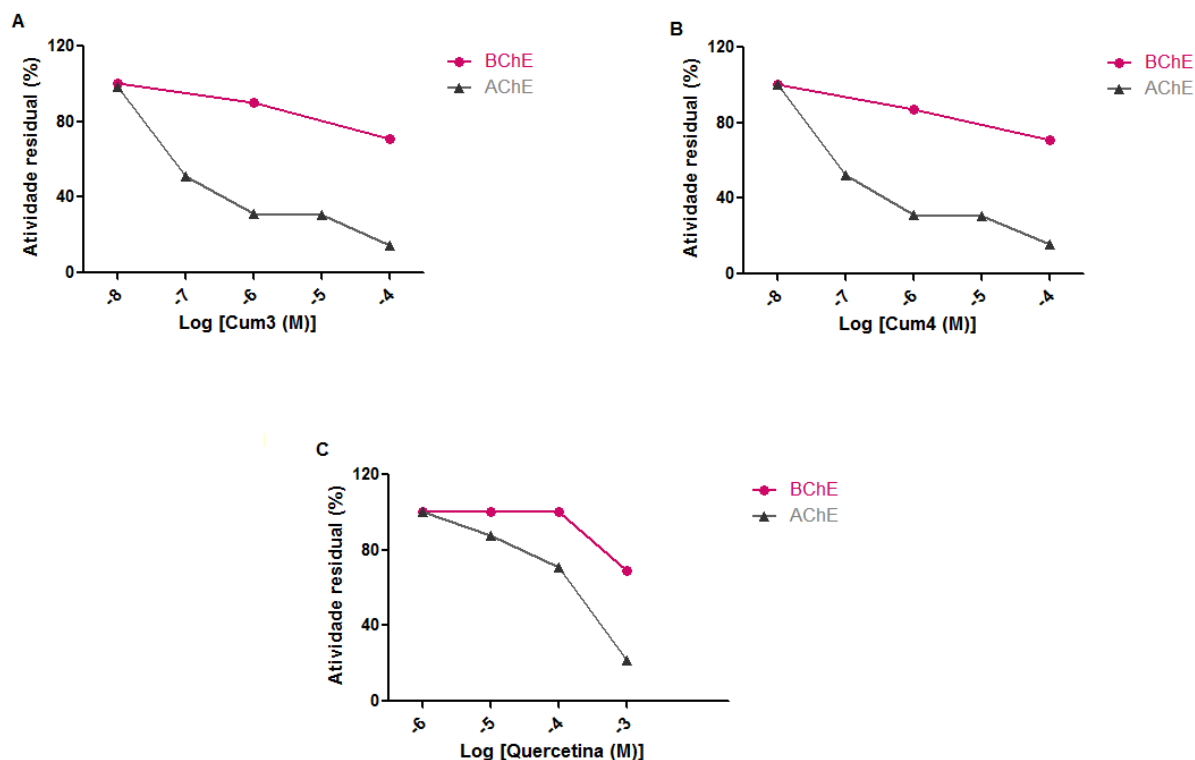


**Figura 25:** Efeito da infusão de boldo sobre a atividade *in vitro* de acetilcolinesterase cerebral e butirilcolinesterase sérica em cães.

Como pode ser observado na Figura 25, a infusão de boldo é capaz de inibir a BChE quando se apresenta em uma concentração mais alta no meio reacional. O trabalho de Hostálková e colaboradores (2015) demonstrou o efeito inibitório de alguns alcaloides de *Peumus boldus* sobre a butirilcolinesterase, como reticulina e N-metilcoclaurina.

Também é possível observar na Figura 25 que a inibição de acetilcolinesterase foi mais expressiva do que a da BChE. Na maior concentração utilizada, a infusão foi capaz de inibir 62% da atividade de AChE contra apenas 25,7% de inibição sobre BChE. Isto sugere, portanto, que as substâncias presentes nesta infusão, quando em conjunto, apresentam melhor interação com o sítio ativo de AChE.

A Figura 26 apresenta os resultados do efeito dos compostos cumarínicos e da quercetina sobre as colinesterases.



**Figura 26:** Efeito de Cum3 (A), Cum4 (B) e quercetina (C) sobre a atividade *in vitro* de acetilcolinesterase cerebral e butirilcolinesterase sérica em cães. De modo a facilitar a comparação entre os efeitos em AChE cerebral e em BChE sérica, os resultados anteriormente apresentados de acetilcolinesterase foram adicionados a estes gráficos.

Como pode ser observado na Figura 26 (A, B e C), os três compostos parecem interagir melhor com o sítio ativo de AChE do que com o sítio de BChE.

A quercetina inibiu aproximadamente 31% da atividade de BChE na maior concentração avaliada (1mM), enquanto no ensaio de inibição de AChE ela foi capaz de inibir aproximadamente 79% da atividade nesta mesma concentração. Os resultados obtidos por Khan e colaboradores (2009) comparando o efeito deste flavonóide em AChE de *Torpedo californica* e BChE de soro de cavalo também mostraram uma eficácia maior sobre AChE em relação à BChE.

Os dois compostos cumarínicos inibiram aproximadamente 29% da atividade de butirilcolinesterase na maior concentração avaliada (0,1mM). Vale lembrar que nesta mesma concentração, ambos os compostos inibiram aproximadamente 85% da atividade de AChE. De uma forma geral, compostos anticolinesterásicos que atuam com nula ou baixa potência sobre BChE parecem ocasionar menos efeitos adversos, uma vez que a butirilcolinesterase atua sobre diferentes tecidos do organismo.



A maioria dos derivados cumarínicos sintetizados por Saeed e colaboradores (2015) também inibiram acetilcolinesterase com mais eficiência do que a butirilcolinesterase. Estes autores avaliaram seus derivados sobre AChE de peixe elétrico e sobre BChE de soro equino. Joubert e colaboradores (2017), por outro lado, mostraram que a maioria dos derivados cumarínicos por eles sintetizados, apresentou maior eficiência na inibição de BChE do que de AChE. Joubert e colaboradores também utilizaram enzimas provenientes de peixe elétrico e de soro equino.

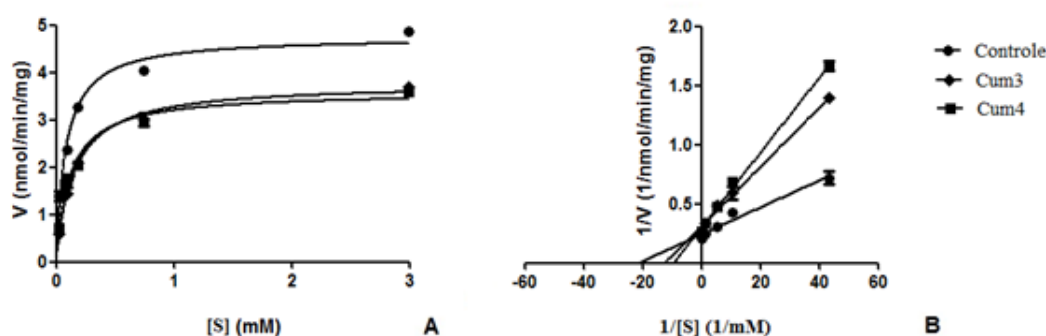
### **3.4.2 Estudo cinético da atividade de acetilcolinesterase**

#### **3.4.2.1 Compostos cumarínicos**

Para confirmar os resultados obtidos com o docking de Cum3 e Cum4, avaliou-se o potencial inibitório destes dois compostos sob diferentes concentrações de substrato no meio reacional.

Para esta análise foram construídos gráficos do tipo Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk, também conhecido como duplo recíproco. Neste último, a intersecção no eixo y corresponde a  $1/V_{máx}$ , enquanto a intersecção no eixo x corresponde a  $-1/K_M$ .

A Figura 27 e a Tabela 4 apresentam os resultados obtidos pelo uso dos compostos Cum3 e Cum4.  $K_i$  representa a constante de inibição competitiva, enquanto  $K_i'$  representa a constante de inibição mista.



**Figura 27:** Determinação do efeito inibitório da Cum3 (0,03  $\mu$ M) e Cum4 (0,03  $\mu$ M) sobre a atividade de acetilcolinesterase em cérebro de *Canis familiaris* sob diferentes concentrações de substrato. A) Gráfico do tipo Michaelis-Menten: velocidade da hidrólise do substrato *versus* concentração do substrato. B) Gráfico do tipo Lineweaver-Burk com valores invertidos de velocidade e concentração.

**Tabela 4:** Parâmetros cinéticos obtidos através da construção dos gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk.

Parâmetros obtidos através do gráfico de Michaelis-Menten			
Parâmetros cinéticos	Sem inibidor	Cum3 0,03 $\mu$ M	Cum4 0,03 $\mu$ M
$V_{m\acute{a}x}$	4,785 ( $\pm$ 0,16)	3,566 ( $\pm$ 0,14)	3,734 ( $\pm$ 0,17)
$K_M$	0,089 ( $\pm$ 0,013)	0,115 ( $\pm$ 0,019)	0,143 ( $\pm$ 0,026)
$K_i$	-	12,3	11,33
$K_i'$	-	39,48	30,33
Parâmetros obtidos através do gráfico de Lineweaver-Burk			
Parâmetros cinéticos	Sem inibidor	Cum3 0,03 $\mu$ M	Cum4 0,03 $\mu$ M
$V_{m\acute{a}x}$	4,264 ( $\pm$ 0,74)	3,258 ( $\pm$ 0,42)	3,381 ( $\pm$ 0,44)
$K_M$	0,050 ( $\pm$ 0,017)	0,083 ( $\pm$ 0,018)	0,109 ( $\pm$ 0,022)

Unidades:  $V_{m\acute{a}x}$ = nmol/min/mg de proteína.  $K_M$ = mM.  $K_i$ = nM.

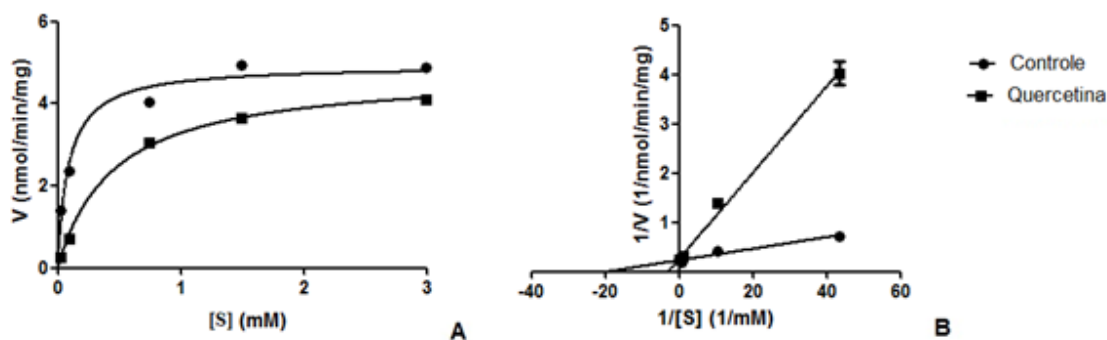
Como pode ser observado na Figura 27 A, a presença dos dois inibidores reduz a velocidade da reação, entretanto não é possível observar através deste gráfico se há alteração significativa na velocidade máxima da mesma. Por outro lado, a Figura 27 B evidencia que os pontos onde as retas cortam o eixo de y são bastante semelhantes, mostrando haver apenas uma diferença discreta na  $V_{m\acute{a}x}$  da reação, como pode ser confirmado na Tabela 4. Enquanto isso, os pontos onde as retas cortam o eixo de x diferem bastante entre si, mostrando alteração significativa no valor de  $K_M$ , confirmada na Tabela 4. Desta forma, é possível afirmar que os compostos Cum3 e Cum4 apresentam tendência para inibição do tipo competitiva. Entretanto, o fato do valor de  $V_{m\acute{a}x}$  ser ligeiramente reduzido na presença do inibidor corrobora a interação destes compostos com o resíduo Trp314 do sítio periférico, mostrada no estudo computacional.

Assim, estes inibidores podem ser classificados como inibidores mistos com predileção para inibição do tipo competitiva.

Pode ser observado também através da análise da Tabela 4 que o  $K_i$  de ambos os compostos é expressivamente baixo, o que mostra que estes inibidores são altamente eficazes. No estudo de Pisani e colaboradores (2010) com derivados cumarínicos também foram encontrados valores de  $K_i$  na ordem nanomolar.

### 3.4.2.2 Quercetina

Para complementar as análises da quercetina, também foi realizado o estudo cinético com este fitoquímico. A Figura 28 e a Tabela 5 apresentam os resultados obtidos.  $K_i$  representa a constante de inibição competitiva, enquanto  $K_i'$  representa a constante de inibição mista.



**Figura 28:** Determinação do efeito inibitório da quercetina (0,1 mM) sobre a atividade de acetilcolinesterase em cérebro de *Canis familiaris* sob diferentes concentrações de substrato. A) Gráfico do tipo Michaelis-Menten: velocidade da hidrólise do substrato *versus* concentração do substrato. B) Gráfico do tipo Lineweaver-Burk com valores invertidos de velocidade e concentração.

**Tabela 5:** Parâmetros cinéticos obtidos através da construção dos gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk.

Parâmetros obtidos através do gráfico de Michaelis-Menten		
Parâmetros cinéticos	Sem inibidor	Com inibidor (Quercetina 0,1mM)
$V_{m\acute{a}x}$	4,928 ( $\pm 0,32$ )	4,76 ( $\pm 0,2$ )
$K_M$	0,089 ( $\pm 0,036$ )	0,451 ( $\pm 0,072$ )
$K_i$	-	23,92
$K_i'$	-	28,65

Parâmetros obtidos através do gráfico de Lineweaver-Burk		
Parâmetros cinéticos	Sem inibidor	Com inibidor (Quercetina 0,1mM)
$V_{m\acute{a}x}$	4,423 ( $\pm 0,37$ )	4,009 ( $\pm 0,94$ )
$K_M$	0,056 ( $\pm 0,02$ )	0,672 ( $\pm 0,48$ )

Unidades:  $V_{m\acute{a}x}$  = nmol/min/mg de proteína.  $K_M$ = mM.  $K_i$ =  $\mu$ M.

Como pode ser observado na Figura 28 A, apesar da quercetina inibir a atividade de AChE, os valores da  $V_{m\acute{a}x}$  são bastante semelhantes. A Figura 28 B também mostra com maior clareza que não há alteração significativa na  $V_{m\acute{a}x}$ , uma vez que os pontos onde ambas as retas cortam o eixo de y são muito próximos. Esta evidência também é confirmada na Tabela 7. A Figura 28 B também mostra que os pontos onde as duas retas cortam o eixo de x são bastante distintos, o que demonstra uma diferença expressiva no valor de  $K_M$ , confirmada na Tabela 7. Desta forma, é possível afirmar que a quercetina apresentou um comportamento de inibidor competitivo de AChE, como descrito por Khan e colaboradores (2009) em AChE de *Torpedo californica*.

Vale ressaltar que os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  obtidos nos homogeneizados controles deste trabalho, de forma geral, se assemelham a valores obtidos por outros autores, embora no presente estudo, os valores tenham sido ligeiramente menores. Como mostrado na Tabela 2, o valor de  $V_{m\acute{a}x}$  de AChE no homogeneizado de cérebro canino foi de aproximadamente 4,6 nmol/min/mg e o valor de  $K_M$  foi de aproximadamente 0,07 mM. Jebali e colaboradores (2011) encontraram  $V_{m\acute{a}x}$  de 179,1 nmol/min/mg e  $K_M$  de 0,34 mM em *Cerastoderma glaucum* (animal total) e  $V_{m\acute{a}x}$  de 36,48 nmol/min/mg e  $K_M$  de 2,06 mM nas guelras destes animais. Dave e colaboradores (2000) encontraram  $V_{m\acute{a}x}$  de 126,9 nmol/min/mg e  $K_M$  de 0,036 mM em homogeneizado (sobrenadante) de cérebro de rato. Uma justificativa para a discrepância entre

as velocidades máximas obtidas no homogeneizado de cérebro de cães do presente estudo e no homogeneizado de cérebro de rato do trabalho de Dave e colaboradores (2000) é o fato dos cães deste trabalho terem tido uma morte de forma natural. Assim, pode ter havido perda de parte da atividade enzimática no tempo decorrido entre a morte do animal e a sua dissecação. Apesar disso, o nível de atividade de AChE mantido no homogeneizado de cérebro canino do presente estudo mostrou-se satisfatório para o estudo da inibição desta enzima.

### 3.4.3 Ensaio de toxicidade em leveduras

Em colaboração com o Laboratório de Estresse Oxidativo em Microorganismos foi avaliada a toxicidade do composto Cum3 em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados da análise são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Ensaio de citotoxicidade do composto Cum3 da série I de cumarinas em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Toxicidade	Média do n° de colônias (Experimento I)	Média do n° de colônias (Experimento II)
Controle	98,5	71
Cum3 (10µM)	96,5	70
Cum3 (100µM)	108	69,5

Como pode ser observado na Tabela 6, o composto Cum3 não se apresenta como tóxico à levedura, uma vez que as médias dos números de colônias não diferiram de forma significativa entre os grupos. Uma vez que a única diferença entre os compostos Cum4 e Cum3 é a presença de um radical benzila no lugar do Br, respectivamente, sugere-se que Cum4 também não seja tóxico a *S. cerevisiae*.

Não foi necessária a realização do ensaio em leveduras com a quercetina uma vez que estes resultados já têm sido apresentados na literatura. Soares e colaboradores (2005) mostraram um significativo aumento da sobrevivência de *S. cerevisiae* tratadas com agente estressor juntamente com a quercetina. Concluíram, portanto, que a quercetina possui potencial antioxidante significativo. Vilaça e colaboradores (2012) também mostraram que este flavonóide protege *S. cerevisiae* do estresse oxidativo. E, segundo Belinha e colaboradores

(2007), a quercetina, além de aumentar a resistência ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae*, é capaz de aumentar o tempo de vida cronológico.

## 4 CONCLUSÃO

Foi possível observar através dos resultados obtidos, que os compostos Cum3 e Cum4 agem como potentes inibidores competitivos da atividade *in vitro* de AChE cerebral e apresentam pouco efeito sobre a atividade *in vitro* de BChE sanguínea em cães. Uma vez que a Cum3 não apresentou nível de toxicidade significativo sobre células de levedura, acredita-se que ambos os compostos - devido à semelhança estrutural entre Cum3 e Cum4 – não sejam tóxicos a células animais. Entretanto, é importante ressaltar que os resultados aqui obtidos, embora bastante promissores, consistem em resultados ainda iniciais. Assim, faz-se estritamente necessária a análise da toxicidade e da eficácia *in vivo* destes compostos em animais, visando o uso futuro dos mesmos como adjuvantes no tratamento da DCC.

Também foi observado neste trabalho que a infusão de boldo comercial aqui utilizado age como inibidor significativo da atividade *in vitro* de AChE em cérebro de cães e que apresenta efeito antioxidante sobre células de levedura. Em concentrações altas, esta infusão também se mostra capaz de inibir a atividade sérica de BChE. Uma vez que as infusões são compostos de baixo custo e de fácil preparo, estes resultados tornam-se bastante interessantes. Tanto o potencial anticolinesterásico quanto o potencial antioxidante da infusão de boldo podem ser decorrentes da presença de constituintes como a quercetina. A quercetina mostrou inibir de forma significativa e competitiva a atividade de AChE cerebral e apresentou ligeira inibição sobre BChE sanguínea. Embora não tenha sido tão potente como alguns compostos sintéticos deste trabalho, o fato de ser uma molécula natural de uso já consolidado na medicina veterinária torna seus resultados bastante promissores. Entretanto, é necessário avaliar o real efeito *in vivo* da quercetina em pacientes com DCC e a segurança deste possível tratamento em cães.

## CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível concluir através deste trabalho que os compostos Cum3, Cum4, quercetina e a infusão de boldo apresentam propriedades relevantes para o tratamento da Disfunção Cognitiva Canina. Uma vez que os cães são apontados como modelos para estudo da Doença de Alzheimer, pode-se concluir que estes compostos também podem vir a ser importantes para o tratamento desta patologia. Entretanto, é importante ressaltar que os resultados aqui apresentados estão ainda em fase inicial. Outros estudos devem ser feitos para que estes compostos possam vir a ser utilizados no tratamento destas doenças.

Também foi possível concluir através deste trabalho que, embora as enzimas aqui analisadas não atuem como biomarcadores sensíveis e específicos para a DCC, a continuação do estudo com as colinesterases, catalase e GST é relevante. Pesquisas sobre a DCC ou sobre a DA que tenham estas atividades como foco podem vir a apresentar ferramentas futuras de monitoração da evolução da doença e de resposta ao tratamento escolhido.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, C. A. et al. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. **Clinical Science**, v. 85, n. 1, p. 77-81, 1993.
- ABRAZ: Associação Brasileira de Alzheimer - **Atualizações Científicas**. <http://abraz.org.br/web/sobre-alzheimer/atualizacoes-cientificas/> Acesso em 26 de maio de 2019.
- ADAMS, B.; CHAN, A.; CALLAHAN, H.; MILGRAM, N. The Canine as a Model of Human Cognitive Aging: Recent developments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 24, p. 675-692, 2000.
- AKASSOGLU, K. et al. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 5075-5080, 2004.
- AKKAYA, C.; YAVUZER, S.S. ; YAVUZER, H.; ERKOL, G.; BOZLUOLCAY, M.; DINÇER, Y. DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione redox status in patients with Alzheimer's disease treated with and without memantine. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 378, p. 158-162, 2017.
- ALKALAY, A. et al. Plasma acetylcholinesterase activity correlates with intracerebral  $\beta$ -amyloid load. **Current Alzheimer Research**, v. 10, n. 1, p. 48, 2013.
- ALLOCATI, N.; MASULLI, M.; DI ILIO, C.; FEDERICI, L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, v. 7, n. 1, p. 8, 2018.
- ALMEIDA, J. R. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer**. 2011. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2011.
- ALMEIDA, J. R. **Planejamento, ensaio e otimização in silico de novos protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase**. 2015. 39 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2015.
- AMARAL, F. G. **Efeito de extractos aquosos de *Plectranthus barbatus* e de *Peumus boldus* na acção do etanol e na absorção conjunta de colesterol em linhas celulares**. 2011. 65 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade de Lisboa, Lisboa. 2011.
- ANAND, P.; SINGH, B.; SINGH, N. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 3, p. 1175-1180, 2012.
- ANDRADE, C. A. **O papel do peróxido de hidrogênio na tolerância de soja (*Glycine max*) ao alagamento**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2013.
- AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Inhibition of GTRAP3-18 May Increase Neuroprotective Glutathione (GSH) Synthesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, 2012.
- ARAUJO, J. et al. Cholinesterase inhibitors improve both memory and complex learning in aged beagle dogs. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 26, n. 1, p. 143-155, 2011.
- ARENDT, T.; BRUCKNER, M. K.; LANGE, M.; BIGL, V. (1992). Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic

development—a study of molecular forms. **Neurochemistry international**, v. 21, n. 3, p. 381-396.

ASHRAF, G. M. et al. The possibility of an infectious etiology of Alzheimer disease. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 6, p. 4479-4491, 2019.

AUDI, E. A.; PUSSI, F. D. Isoenzimas do CYP450 e biotransformação de drogas. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 599-604, 2000.

AZEVEDO, D. et al. Espectroscopia de prótons na doença de Alzheimer e no comprometimento cognitivo sem demência: estudo de uma amostra comunitária. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1021-1027, 2005.

BADJA, M. et al. Structure-Based Search for New Inhibitors of Cholinesterases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 5608-5632, 2013.

BAGATINI, M. **Avaliação da atividade de enzimas que degradam nucleotídeos de adenina e ésteres de colina e estudo do perfil oxidativo em pacientes com cardiopatia isquêmica**. 2010. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

BASHA, M. R. et al. The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta-amyloid in the aging brain. **Journal Neuroscience**, v. 25, n. 4, p. 823-829, 2005.

BARBOSA FILHO, J. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 258-285, 2006.

BARTUS, R. T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217teoria, p. 408-414, 1982.

BASSO, P. et al. Biomarcadores inflamatórios e indicadores de estresse oxidativo em cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia convencional, por NOTES híbrida e NOTES total. **Ciência Rural**, v. 44, n. 5, p. 884-890, 2014.

BAWASKAR, H. S.; BAWASKAR, P. H.; BAWASKAR, P. H. RBC acetyl cholinesterase: A poor man's early diagnostic biomarker for familial alzheimer's and Parkinson's disease dementia. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v.6, n. 1, p. 33-38, 2015.

BELINHA, I.; AMORIM, M. A.; RODRIGUES, P.; FREITAS, V.; MORADAS-FERREIRA, P.; MATEUS, N.; COSTA, V. Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2446-2451, 2007.

BELO, M. F.; SOUZA, A. L. Estudo cinético da enzima catalase (EC 1.11. 1.6) de extrato bruto de batata doce (*Ipomoea batatas*). **Scientia Plena**, v. 12, n. 7, 2016.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BICCA, M. **A participação do receptor TRPA-1 na toxicidade induzida por oligômeros de beta-amilóide em diferentes modelos experimentais: um potencial novo alvo para a Doença de Alzheimer**. 2016. 278 p. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016.

BOBERG, D. R.; FURTADO-ALLE, L.; SOUZA, R. L.; CHAUTARD, E. A. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 452-454, 2010.

- BOEIRA, J. M.; SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 89, n. 6, p. 287-294, 2001.
- BOLZÁN, A. D.; BIANCHI, N. O.; LARRAMENDY, M. L.; BIANCHI, M. S. Chromosomal sensitivity of human lymphocytes to bleomycin. Influence of antioxidant enzyme activities in whole blood and different blood fractions. **Cancer Genet Cytogenet**, y. 64, p. 133-138, 1992.
- BONO, G. F. **Investigação de associação entre a Butirilcolinesterase e a doença de Alzheimer**. 2014. 96 p. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2014.
- BORRAS, D.; FERRER, I.; PUMAROLA, M. Age-related changes in the brain of the dog. **Veterinary Pathology Online**, v. 36, n. 3, p. 202-211, 1999.
- BOSCH, M. et al. Dogs with cognitive dysfunction syndrome: a natural model of Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 9, n. 3, p. 298-314, 2012.
- BOWEN, J.; HEATH, S. Geriatric behavioural issues. *In: Behaviour problems in small animals. Practical advice for the veterinary team*. London: WB Saunders, 2005. p. 59-69.
- BOYLE, P. A. et al. Mild cognitive impairment: risk of Alzheimer disease and rate of cognitive decline. **Neurology**, v. 67, n. 3, p. 441-445, 2006.
- BRASIL. **Portaria Conjunta nº 13, de 28 de novembro de 2017**. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Alzheimer. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/dezembro/08/465660-17-10-MINUTA-de-Portaria-Conjunta-PCDT-Alzheimer-27-11-2017---COMPLETA.pdf>>. Acesso em: 27 julho 2018.
- BRAZ, P. H.; HANIU, A. E. C. J.; DE SOUZA, A. I.; BRUM, K. B. Epidemiologia do mastocitoma em cães em uma região do Mato Grosso do Sul. **Pubvet**, 11, 0947-1073, 2017.
- BROADFOOT, P. J. et al. **Integrating Complementary Medicine into veterinary Practice**. John Wiley e Sons, 2009, 928 p.
- BUSCHE, M. A. et al. Tau impairs neural circuits, dominating amyloid- $\beta$  effects, in Alzheimer models in vivo. **Threshold**, v. 30, n. 40, p. 50, 2019.
- CADONIC, C.; SABBIR, M. G.; ALBENSI, B. C. Mechanisms of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 9, p. 6078-6090, 2016.
- CAETANO, L. A. O.; SILVA, F. S. D.; SILVEIRA, C. A. B. Alzheimer, sintomas e grupos: uma revisão integrativa. **Vínculo**, v. 14, n. 2, 84-93, 2017.
- CAMATTI-SARTORI, V. Atividade biológica de aveloz (*Euphorbia tirucalli*), boldo (*Pneumus boldus*) e cânfora (*Cinnamomun camphora*) sobre *Alternaria* sp e *Fusarium* sp. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 13871, 2013.
- CARAMELLI, P. et al. Diagnóstico de doença de Alzheimer no Brasil. **Brazil: Dementia e Neuropsychologia**, v. 5, n. 1 p. 11-20, 2011.
- CASIDA, J.; QUISTAD, G. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 8, p. 983-998, 2004.
- CARLETTI-CASSANI, A. F. **Perfusão por ressonância magnética (arterial spin labeling) em pacientes com doença de Alzheimer leve e comprometimento cognitivo leve e sua**

**relação com o desempenho cognitivo.** 2019. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2019.

CHAPAGAIN, D.; RANGE, F.; HUBER, L.; VIRÁNYI, Z. Cognitive Aging in Dogs. **Gerontology**, 2017.

CHEN, Y, et al. Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* in the forced swimming test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 451-459, 2005.

CHICO, D. E.; LISTOWSKY, I. Diverse expression profiles of glutathione-S-transferase subunits in mammalian urinary bladders. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 435, n. 1, p. 56-64, 2005.

CHIOUA, M et al. Taciprimidines, the first tacrine-dihydropyrimidine hybrids, as multi-target-directed ligands for Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, 839-846, 2018.

CHIPPERFIELD, B.; NEWMAN, P.; MOYES, I. Decreased erythrocyte cholinesterase activity in dementia. **The Lancet**, v. 318, n. 8239, p. 199, 1981.

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

CORNEC, A. S. Multitargeted Imidazoles: Potential Therapeutic Leads for Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 5120-5145, 2017.

COSTA, E. M. M. B.; OLIVEIRA, V.; PIMENTA, F. C. Citocromos P450 e biotransformação microbiana. **Atualização**, v. 33, p. 21-31, 2004.

COSTA, P. **Atividade da NTPDase, 5-nucleotidase, acetilcolinesterase e níveis de peroxidação lipídica em ratos expostos ao cádmio e tratados com curcumina.** 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2014.

COTMAN, C. W. et al. Brain aging in the canine: a diet enriched in antioxidants reduces cognitive dysfunction. **Neurobiology of aging**, v. 3, n. 5, p. 809-818, 2002.

COTMAN, C. W.; HEAD, E. The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 15, n. 4, p. 685-707, 2008.

CRISTALLI, D. et al. Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 314, n. 1, p. 48-56, 2012.

DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 2, p. 324-352.

DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 13, n. 12, p. 214-221, 2007.

DAVE, K. R.; SYAL, A. R.; KATYARE, S. S. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, n. 1-2, p. 100-108, 2000.

DE ALMEIDA, G. et al. Perfil clínico-epidemiológico da fibrilação atrial espontânea em cães. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 19, n. 1, p. 20-28, 2006.

DGACHI, Y. et al. Synthesis and biological evaluation of benzochromenopyrimidinones as cholinesterase inhibitors and potent antioxidant, non-hepatotoxic agents for Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 634, 2016.

DECKER, H. **Disfunção Sináptica e Comprometimento do Transporte Axonal induzidos por Oligômeros do Peptídeo  $\beta$ -amilóide**. 2010. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010.

DEWEY, C.; COSTA, R. **Practical guide to canine and feline neurology**. 3 ed. Wiley Blackwell, 2015. 688 p.

DIDZIAPETRIENĖ, J. et al. Significance of blood serum catalase activity and malondialdehyde level for survival prognosis of ovarian cancer patients. **Medicina**, v. 50, n. 4, p. 204-208, 2014.

DIETZ, A. et al. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **American journal of human genetics**, v. 24, n. 1, p. 58, 1972.

DINIZ, L. P. Astrocyte transforming growth factor beta 1 promotes inhibitory synapse formation via CaM kinase II signaling. **Glia**, v. 62, n. 12, p. 1917-1931, 2014.

DINIZ, L. P. Astrocyte transforming growth factor beta 1 protects synapses against A $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease model. **Journal of Neuroscience**, 3351-16, 2017.

DURASEVIC, S. et al. The influence of vitamin e supplementation on the oxidative status of rat liver. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 3, p. 677-681, 2010.

ELLMAN, G. L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p.88-95, 1961.

ENSINO prático e teórico-prático: Determinação da actividade enzimática de colinesterases. Aula prática 8. Disciplina de Bioquímica I. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2007. 7p.

ESTEVIÃO, I. **Influência dos níveis de ferritina sérica, das mutações no gene da beta globina e dos valores das enzimas de detoxificação catalase e glutatona S-transferase na expressão fenotípica de Beta Talassemia Heterozigota**. 2011. 152 f. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Estadual Paulista, SP. 2011.

EYER, P. et al. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. **Analytical biochemistry**, v. 312, n. 2, p. 224-227, 2003.

EVANS, R.; WROW, J. 1978. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. **Clinical Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 1762-1766.

FALÉ, P. et al. Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of Peumus boldus water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2656-2662, 2012.

FAST, R. et al. An observational study with long-term follow-up of Canine Cognitive Dysfunction: clinical characteristics, survival, and risk factors. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 822-829, 2013.

- FERNANDES, T. **Análise fitoquímica de duas espécies de Rutaceae: *Helietta apiculata* benth e *Zanthoxylum fagara* (L.) sarg.** 2016. 170 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2016.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, R. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante *in vivo* de flavonoides isolados de *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1093-1097, 2016.
- FOIDL, B. et al. Cholinergic neurodegeneration in an Alzheimer mouse model overexpressing amyloid-precursor protein with the Swedish-Dutch-Iowa mutations. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 136, p. 86-96, 2016.
- FOLEGO, G. **ADNet: Diagnóstico assistido por computador para Doença de Alzheimer usando Rede Neural Convolutiva 3D com cérebro inteiro.** 2018. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2018.
- FORLENZA, O.; GATTAZ, W. Influência de mecanismos colinérgicos nos processos neurodegenerativos relacionados à formação de amiloide e à fosforilação da proteína tau. **Revista Psiquiatria Clínica**, v. 25, n. 3, p. 114-117, 1998.
- FOSSUM, T. **Cirurgia de pequenos animais.** 3 ed. Brasil. Elsevier, 2008. 1314 p.
- FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 66, n. 2, p. 137-147, 1999.
- FREIRE, D. Dispositivo eletrônico detecta moléculas ligadas a câncer, Alzheimer e Parkinson. Agência FAPESP, 2016. Disponível em: [http://agencia.fapesp.br/dispositivo\\_eletronico\\_detecta\\_moleculas\\_ligadas\\_a\\_cancer\\_alzheimer\\_e\\_parkinson/23098/](http://agencia.fapesp.br/dispositivo_eletronico_detecta_moleculas_ligadas_a_cancer_alzheimer_e_parkinson/23098/) Acesso em: 28 setembro 2017.
- FREITAS, D. R. J.; VAZ JUNIOR, I. S.; MASUDA, A. Expressão e atividade enzimática de glutatona s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v. 17, n. 2, p. 99-104, 2008 .
- FREITAS, L. **Síntese de 1,2,3-triazóis com potencial atividade biológica e como precursores de carbenos mesoiônicos n-heterocíclicos.** 2014. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.
- FUKUMOTO, H. et al.  $\beta$ -Secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 59, n. 9, p. 1381-1389, 2002.
- FURLANELLO, T. et al. Validation of an automated spectrophotometric assay for the determination of cholinesterase activity in canine serum. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 7, p. 723-733, 2006.
- GANDY, S.; BARTFAI, T.; LEES, G. V.; SANO, M. Midlife interventions are critical in prevention, delay, or improvement of Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment and dementia. **F1000Research**, v.6, p. 413, 2017.
- GARCÍA AYLLÓN, M. et al. Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma. **Plos One**, v. 5, n. 1, p. 8701, 2010.

- GHOSAL, S.; MEHTA, R.; BHATTACCHARYA, S. K. Naturally occurring and synthetic  $\beta$ -carbolines as cholinesterase inhibitors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 808-810, 1972.
- GHOSH, A.; BRINDISI, M.; TANG, J. Developing  $\beta$ -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. s1, p. 71-83, 2012.
- GIACOBINI, E. Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? **Drugs Aging**, v. 18, n. 12, p. 891-898, 2001.
- GIORDANO, C. et al. Amyloid-beta neuroprotection mediated by a targeted antioxidant. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4983, 2014.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, A. et al. Plasma  $\beta$ -amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 7, p. 590-596, 2011.
- GOTH, L.; NAGY, T., PARAGH, G.; KAPLAR, M. Blood Catalase Activities, Catalase Gene Polymorphisms and Acatlasemia Mutations in Hungarian Patients with Diabetes Mellitus. **Global Journal Of Obesity Diabetes And Metabolic Syndrome**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2016.
- GONÇALVES, E. A. G.; CARMO, J. S. Diagnóstico da doença de Alzheimer na população brasileira: um levantamento bibliográfico. **Revista Psicologia e Saúde**, v. 4, n. 2, 2012.
- GREENAMYRE, J. T.; MARAGOS, W. F.; ALBIN, R. L.; PENNEY, J. B.; YOUNG, A. B. (1988). Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 12, n. 4, p. 421-430, 1988.
- HAMID, N. et al. Effect of vitamin E (Tri E) on antioxidant enzymes and DNA damage in rats following eight weeks exercise. **Nutrition Journal**, v. 10, n. 37, 2011.
- HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184, 1992.
- HEAD, E. Brain Aging in Dogs: Parallels with Human Brain Aging and Alzheimer's Disease. **Veterinary Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 247-260, 2001.
- HEAD, E. Neuropathology in ageing dogs. *In: Hill's European Symposium on Canine Brain Aging*. 2002. p 10-12.
- HEAD, E. et al. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, n. 2, p. 375-381, 2002.
- HEAD, E. A canine model of human aging and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 9, p. 1384-1389, 2013.
- HEATH, S. Behaviour problems in geriatric pet. *In: HORWITZ, D. F.; MILLS, D. S.; HEATH, S. BSAVA Manual of Canine and Feline Behavioural Medicine*. Waterwells: British Small Animal Veterinary Association, 2002. p. 109-118.
- HECKLER, M. et al. Síndrome da Disfunção Cognitiva em cães. **Clínica Veterinária**, v. 90, p. 70-74, 2011.
- HEIBLUM, M.; LABASTIDA, R.; CHAVES, G.; TEJEDA, A. "Didy," a clinical case of cognitive dysfunction syndrome. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 2, p. 68-72, 2007.
- HERNANDEZ, M. et al. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. **Food chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1076-1082, 2010.

HORWITZ, D.; NEILSON, J. Disfunção cognitiva: caninos e felinos. *In: Blackwell's – Consulta Veterinária em 5 minutos: Comportamento canino e felino*, São Paulo, 2008. p. 378-386.

HOST'ÁLKOVÁ, A. et al. Alkaloids from *Peumus boldus* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition activity. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 4, p. 577-580, 2015.

HU, X.; DAS, B.; HOU, H.; HE, W.; YAN, R. BACE1 deletion in the adult mouse reverses preformed amyloid deposition and improves cognitive functions. **Journal of Experimental Medicine**, 2018.

INESTROSA, N. C. et al. Blood markers in Alzheimer disease: subnormal acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in lymphocytes and erythrocytes. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 122, n. 1, p. 1-5, 1994.

INOUYE, K; OLIVEIRA, G. Avaliação crítica do tratamento farmacológico atual para doença de Alzheimer. **Infarma**, v. 15, n. 11-12, p. 80-84, 2004.

JACKISCH, R. et al. Inhibitory potency of choline esterase inhibitors on acetylcholine release and choline esterase activity in fresh specimens of human and rat neocortex. **Journal Alzheimers Disease**, v. 16, n. 3, p. 635-647, 2009.

JAZAYERI, S. et al. A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 17, 2014.

JEBALI, J. et al. Characterization and evaluation of cholinesterase activity in the cockle *Cerastoderma glaucum*. **Aquatic Biology**, v. 13, n. 3, p. 243-250, 2011.

JOHNSON, M. K. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. **Biochemical Journal**, v. 114, p. 711-717, 1969.

JOHNSON, M. K. Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. **Archives of Toxicology**, v. 37, p. 113-115, 1977.

JOUBERT, J. et al. Synthesis and evaluation of 7-substituted coumarin derivatives as multimodal monoamine oxidase-B and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 853-864, 2017.

KAPETANOVIC, I. M. et al. Exposure and toxicity of green tea polyphenols in fasted and non-fasted dogs. **Toxicology**, v. 260, n. 1, p. 28-36, 2009.

KATINA, S.; FARBAKOVA, J.; MADARI, A.; NOVAK, M.; ZILKA, N. factors for canine cognitive dysfunction syndrome in Slovakia. **Acta Veterinary Scandinavica**, v. 58, n. 17, 2016.

KREUTZ, F. **Efeito do peptídeo beta-amilóide sobre a biossíntese de gangliosídeos e avaliação da atividade neuroprotetora do GM1**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2010.

KRSKOVA, Z.; MARTIN, J.; DUSEK, J. The inhibition activity of selected beta-carboline alkaloids on enzymes of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Ceska a Slovenska Farmacie**, v. 60, n. 3, p. 125-131, 2011.



KRSTIC, D.; KNUESEL, I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 1, 25, 2013.

GALAN, A. et al. Comparative study of select biochemical markers in cerebrospinal fluid of healthy dogs before and after treatment with nutraceuticals. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 1, p. 72-77, 2014.

GHANEI-NASAB, S. et al. Synthesis and anticholinesterase activity of coumarin-3-carboxamides bearing tryptamine moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, p. 40-46, 2016.

GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 3-4, p. 515-522, 2003.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

HOLLMAN, A.; TCHOUNWOU, P.; HUANG, H. The association between gene-environment interactions and diseases involving the human GST superfamily with SNP variants. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 4, p. 379, 2016.

JONES, C. K.; BYUN, N.; BUBSER, M. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p. 16-42, 2012.

KUMAR, S.; TRIVEDI, P. K. Glutathione S-transferases: role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

LAN, J. et al. Design, synthesis and evaluation of novel cinnamic acid derivatives bearing N-benzyl pyridinium moiety as multifunctional cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, 2017.

LANDSBERG, G.; HUNTHASUEN, W.; ACKERMAN, L. The effects of aging on the behavior of senior pets. *In: Handbook of Behavior Problems of the Dog and Cat*, 2 ed. Saunders: Edinburgh, 2003. p. 269 – 304.

LANDSBERG, G. Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 3, p. 471-479, 2005.

LANDSBERG, Gary. Therapeutic options for cognitive decline in senior pets. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 42, n. 6, p. 407-413, 2006.

LANDSBERG, G. M.; MALAMED, R. Clinical picture of canine and feline cognitive impairment. *In: LANDSBERG, G.; MAD´ARI, A.; ZILKA, N. Canine and Feline Dementia*. Springer, Cham. 2017. p. 1-12.

LASSED, S. et al. Protective Effect of Green Tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) against Prostate Cancer: From In Vitro Data to Algerian Patients. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

LEE, D. J.; LOZANO, A. M. Current Status of Deep Brain Stimulation for Alzheimer's Disease: From Chance Observation to Clinical Trials. *In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 2019.

- LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. Destabilizing Alzheimer's A $\beta$ 42 protofibrils with Morin: mechanistic insights from molecular dynamics simulations. **Biochemistry**, v. 49, n. 18, p. 3935-3946, 2010.
- LEVIN, E.; SIMON, B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. **Psychopharmacology**, v. 138, n. 3, p. 217-230, 1998.
- LIMA, D. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 7, n. 1, 2008.
- LINHARES, J. J. et al. Polimorfismo em gene do receptor da progesterona (PROGINS) e da glutatona S-transferase (GST) e risco de câncer da mama: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 387-393, 2006.
- LINHARES, A. **Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como biomarcador da exposição ocupacional**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- LISTON, D. et al. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 486, p. 9-17, 2004.
- LIU, H.; HARRELL, L. E.; SHENVI, S.; HAGEN, T.; LIU, R. M. Gender differences in glutathione metabolism in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 6, p. 861-867, 2005.
- LIU, J. Synthesis and characterization of 1H-phenanthro[9,10-d]imidazole derivatives as multifunctional agents for treatment of Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 9, p. 2886-2903, 2014
- LOPES, J. P. **Síntese de dímeros quirais do tipo bis-tacrina com potencial aplicação no tratamento da doença de Alzheimer**. 2014. 142 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014
- LOUZADA, S. M. et al. Efeito da obesidade induzida pela dieta da cafeteria sobre os parâmetros oxidativos no ovário de ratas. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 2, n. 2, p. 92-102, 2013.
- LOVEBIOLOGY - Biology GCSE Revision Quiz. [online]. Disponível em: <http://lovebiology.co.uk/MCImages/MCImages.004.jpg>. Acesso em: 10 abril 2016.
- MALHOTRA, A.; DHAWAN, D. Zinc improves antioxidative enzymes in red blood cells and hematology in lithium-treated rats. **Nutrition Research**, v. 28, p. 43-50, 2008.
- MARQUES, E. F.; VIEIRA, P. C.; SEVERINO, R. P. Alcaloides acridônicos inibem catepsina L e V. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 58-62, 2016.
- MARQUIS, J. K. Pharmacological significance of acetylcholinesterase inhibition by tetrahydroaminoacridine. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 5, p. 1071-1076, 1990.
- MARTINS, M. E. G. Coeficiente de correlação amostral. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 2, 2014.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 380-385, 2006.

MAZZETTI, A. P.; FIORILE, M. C.; PRIMAVERA, A.; BELLO, M. L. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 10-18, 2015.

MCKHANN, G. M. et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & dementia**, v. 7, n. 3, p. 263-269, 2011.

MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. (2012). New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **International Journal of Alzheimer's disease**, 2012.

MENEGHETTI, A. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na toxicidade de oligômeros do peptídeo  $\beta$ -amiloide em cultura organotípica de hipocampo de ratos**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014

MESULAM, M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, n. 4, p. 627-639, 2002.

MIKICIUK-OLASIK, E; SZYMAŃSKI, P.; ŻUREK, E. Diagnostics and therapy of Alzheimer's disease. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, p. 315-325, 2007.

MILGRAM, N. et al. Long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment reduces age-dependent impairment in discrimination and reversal learning in beagle dogs. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 5, p. 753-765, 2004.

MOHAMMADI-FARANI, A.; AHMADI, A.; NADRI, H.; ALIABADI, A. Synthesis, docking and acetylcholinesterase inhibitory assessment of 2-(2-(4-Benzylpiperazin-1-yl) ethyl) isoindoline-1, 3-dione derivatives with potential anti-Alzheimer effects. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p.47, 2013.

MOHAMMADI-KHANAPOSHTANI, M. et al. Potent acetylcholinesterase inhibitors: Design, synthesis, biological evaluation, and docking study of acridone linked to 1, 2, 3-triazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 799-806, 2015.

MOLLATAGHI, A. et al. Anti-acetylcholinesterase, anti- $\alpha$ -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of Beilschmiedia species. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 298-302, 2012.

MONTEIRO, A. B.; DINIZ, J. A. O.; FILHO, F. L. C. Regressão e validação do modelo de correlação entre ce e std: uma contribuição ao estudo do aquífero cabeças. Sudeste da bacia sedimentar do Parnaíba – PI. XVIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 2014.

MORALLES, P. **Biomarcadores sanguíneos para a doença de Alzheimer: avaliação da expressão gênica da ADAM10 e de micro-RNAs**. 2016.125 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2016.

MOURA, D. **Estudo dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos em diferentes modelos biológicos**. 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

NAKAMURA, K. et al. A low activity in dog erythrocytes is due to a very low content of catalase protein despite having a normal specific activity. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 30, p. 823-831, 1998.

- NAKAMURA, K., WATANABLE, M., SASAKI, Y., & IKEDA, T. Purification and characterization of liver catalase in acatalasemic beagle dog: comparison with normal dog liver catalase. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, n. 1, p. 89-98, 2000.
- NEILSON, J.; HART, B.; CLIFF, K.; RUEHL, W. Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 11, p. 1787-1791, 2001.
- NELSON, D.; KIESOW, L. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, P. 474-478, 1972.
- NICHOLLS, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. Enzymology and structure of catalases. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 51-106, 2000.
- NISHIYAMA, F. et al. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v.v30, n. 1, 2010.
- NOH, D.; CHOI, S.; CHOI, H.; LEE, Y.; LEE, K. Evaluation of interthalamic adhesion size as an indicator of brain atrophy in dogs with and without cognitive dysfunction. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 58, n. 5, p. 581-587, 2017.
- NORDBERG, A.; SVENSSON, A. Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. **Drug safety**, v. 19, n. 6, p. 465-480, 1998.
- NORDBERG, A. et al. A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. **The primary care companion for CNS disorders**, v. 15, n. 2, 2013.
- OCAMPO, L.; PAOLO, L.; FUENTES OVIEDO, L. M.; VILLALBA CEBALLOS, F. Predictive capacity of a battery of neuropsychological tests in the early diagnosis of mild cognitive impairment (MCI) in a group of adults. **Encuentros**, v. 13, n. 1, p. 25-35, 2015.
- OLIVEIRA, R. F. MERCES, L.; VELLO, T. P.; BUFON, C. C. B. Water-gated phthalocyanine transistors: Operation and transduction of the peptide-enzyme interaction. **Organic Electronics**, v. 31, p. 217-226, 2016.
- OGANE, N.; GIACOBINI, E.; STRUBLE, R. Differential inhibition of acetylcholinesterase molecular forms in normal and Alzheimer disease brain. **Brain Research**, v. 589, n. 2, p. 307-312, 1992.
- OGATA, M. Mammalian Acatalasemia: The Perspectives of Bioinformatics and Genetic Toxicology. **Acta Medica Okayama**, v. 63, n. 2, p. 121-122, 2009.
- ONDREICKA, R. et al. Relation between levels of vitamins C, E, A and beta-carotene and activity of antioxidant enzyme in the blood. **Bratisl Lek Listy**, v. 99, n. 5, p. 250-254, 1998.
- PANTOJA, L. **Contribuição ao diagnóstico clínico da disfunção cognitiva canina**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2010.
- PANZA, F. et al. Possible role of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and polyunsaturated fatty acids in predementia syndromes and Alzheimer's disease. **Journal Alzheimer disease**, v. 16, n. 3, 467-470, 2009.

PEDRO, M. M. **Pesquisa de actividade inibitória do enzima acetilcolinesterase em extratos aquosos de várias plantas usadas como infusões: identificação de compostos com maior actividade inibitória.** 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade de Lisboa, Lisboa. 2008.

PERRIN, R. et al. Blood activity of Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Alzheimer's disease: a case-control study. **Gerontology**, v. 36, n. 5-6, p. 306-313, 1990.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.

PEYON, A. **Implementação de um bioindicador para a neuropatia tardia induzida por organofosforados (OPDIN).** 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2007.

PFEFFER, R. et al. Measurement of functional activities in older adults in the community. **Journal of Gerontology**, v. 37, n. 3, p. 323-329, 1982.

PIAZZI, L. et al. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 1, p. 423-426, 2008.

PILGER, C.; BARTOLUCCI, C.; LAMBA, D.; TROPSHA, A.; FELLS, G. Accurate prediction of the bound conformation of galanthamine in the active site of torpedocalifornica acetylcholinesterase using molecular docking1. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 19, n. 3-4, p.288-296, 2001.

PINEDA, S.; MAS, A.; IBANEZ, M. Cognitive dysfunction syndrome: update behavioral and clinical evaluations as a tool to evaluate the well-being of ageing dogs. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 46, p. 1-12. 2014.

PISANI, L et al. Discovery of a novel class of potent coumarin monoamine oxidase B inhibitors: development and biopharmacological profiling of 7-[(3-chlorobenzyl)oxy]-4-[(methylamino)methyl]-2H-chromen-2-one methanesulfonate (NW-1772) as a highly potent, selective, reversible, and orally active monoamine oxidase B inhibitor. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6685-6706, 2009.

PISANI, L. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Coumarin Derivatives Tethered to an Edrophonium-like Fragment as Highly Potent and Selective Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors. **ChemMedChem**, v. 5, n. 9, p. 1616-1630, 2010.

PLUMLEE, K. et al. Effect of time and storage temperature on cholinesterase activity in blood from normal and organophosphorus insecticide-treated horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 2, p. 247-249, 1994.

POCERNICH, C. B.; BUTTERFIELD, D. A. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1822, n. 5, p. 625-630, 2012.

PRABHU, K.; BHAT, G.; VASUDEVAN, D. M. Can serum glutathione-s-transferase levels in carcinoma cervix be a predictor of radiation response? **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 95-97, 2005.

PRZEDBORSKI, S. et al. Blood Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase activities in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Neurodegeneration**, v. 5, p. 57-64, 1996.

PUERTAS, M. C. et al. Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 8, p. 625-630, 2012.

QUEZADA, R. **Asociación entre el déficit colinérgico, las disfunciones de la memoria y el metabolismo energético en un modelo de rata**. 2013. 107 F. Tese (Mestrado em Biologia Experimental). Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F., 2013.

RACHAKONDA, V.; PAN, T. H.; LE, W. D. Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they?. **Cell Research**, v. 14, n. 5, p. 349-360, 2004.

RADIC, Z.; REINER, E.; TAYLOR, P. Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. **Molecular Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 98-104, 1991.

RAGHAVENDRA, H. L.; PRASHITH, K. T. R.; KHANUM, F. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Green Tea Polyphenols. **Science, Technology and Arts Research Journal**, v. 3, n. 4, p. 141-142, 2015.

RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. **Acta Biologica Hungarica**, v. 54, n. 2, p. 183-189, 2003.

RAZA, H. Dual Localization of Glutathione S-Transferase in the Cytosol and Mitochondria: Implications in Oxidative Stress, Toxicity and Disease. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 278, n. 22, p. 4243-4251, 2011.

RAZA, A. et al. Pharmacological Evaluation and Docking Studies of 3-Thiadiazolyl- and Thioxo-1,2,4-triazolylcoumarin Derivatives as Cholinesterase Inhibitors. **ISRN Pharmacology**, 2012.

ROBERDS, S. L. et al. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary  $\beta$ -secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 12, p. 1317-1324, 2001.

RODRIGUES, A. A.; BARBONI, S. A.. Revisão bibliográfica sobre a ausência da atividade da catalase em humanos: importância deste conhecimento para cirurgiões dentistas. **Sitientibus**, v. 19, p. 87-98, 1998.

ROFINA, J. E. et al. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v. 1069, n. 1, p. 216-226, 2006.

RUEHL, W.; HART, B. In: DODMAN, N.; SHUSTER, L. **Psychopharmacology of Animal Behavior Disorders**. Blackwell Science, 1998, p.283-303.

RYDBERG, E. H. et al. Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with Torpedo californica Acetylcholinesterase: Binding of Bis (5)-tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 18, p. 5491-5500, 2006.

SACCARO, R. **Atividade de colinesterase sérica em cães antes e durante o uso de coleira impregnada com agente anticolinesterásico**. 2007. 42 f. Especialização em Análises Clínicas Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

SAEED, A. et al. Synthesis, cholinesterase inhibition and molecular modelling studies of coumarin linked thiourea derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 63, p. 58-63, 2015.

SAHARAN, S.; MANDAL, P. K. The emerging role of glutathione in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 40, n. 3. 519-529, 2014.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; KNEZOVIC, A.; OSMANOVIC-BARILAR, J.; REUTTER, W. Therapeutic effect of oral galactose treatment in a rat model of Sporadic Alzheimer-s Disease. **Alzheimer´s and Dementia**, 2014.

SALVIN, H. E. et al. The canine cognitive dysfunction rating scale (CCDR): a data-driven and ecologically relevant assessment tool. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 331-336, 2011.

SANTORO, D. et al. Evaluation on the effects of 0.1% Peumus boldus leaf and Spiraea ulmaria plant extract combination on bacterial colonization in canine atopic dermatitis: A preliminary randomized, placebo controlled, double-blinded study. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 164-170, 2018.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

SBERNA, G. et al. The Amyloid  $\beta$ -Protein of Alzheimer's Disease Increases Acetylcholinesterase Expression by Increasing Intracellular Calcium in Embryonal Carcinoma P19 Cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 3, p. 1177-1184, 1997.

SCHRAG, M. et al. Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. **Neurobiology of disease**, v. 59, p. 100-110, 2013.

SCHUTT, T.; TOFT, N.; BERENDT, M. A comparison of 2 screening questionnaires for clinical assessment of canine cognitive dysfunction. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 10, n. 2, p. 452-458, 2015.

SEIDL, C. **Efeitos da uleína em alvos relacionados com doença de Alzheimer e estudos enzimáticos on-line com enzima beta-secretase imobilizada**. 2014. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2014.

SEOANE, M. **Avaliação da ocorrência das alterações ultrassonográficas na cavidade abdominal, detectadas em cães idosos clinicamente saudáveis atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.

SERRÃO, S. A. et al. Avaliação dos efeitos do flavonóide morina sobre a memória de animais normais e com Alzheimer induzido por D-galactose. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 92, n. 4, p. 384-391, 2011.

SHIMMYO, Y. et al. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 5, p. 819-825, 2008

SHIMOHAMA, S. et al. Changes in nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer-type dementia. **Journal of Neurochemistry**, v. 46, n. 1, p. 288-293, 1986.

SMITH, M. A. C. Doença de Alzheimer. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 03-07, 1999.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 293-302, 2005.

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Reactive oxygen species and the respiratory tract diseases of large animals. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994-1002, 2010.

- SILVA, W. J.; FERRARI, C. K. Metabolismo *mitocondrial, radicais livres e envelhecimento*. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, p. 441-451, 2011.
- SINGH, M. et al. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 70, p. 165-188, 2013.
- SIWAK, C. Behavioural Correlates of Age-Associated Cognitive Changes in Dogs. *In: Hill's European Symposium on Canine Brain Ageing*. Barcelona, 2002. p. 28-30.
- SIWAK, C. et al. Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 2008.
- SNIGDHA, S., DE RIVERA, C., MILGRAM, N., COTMAN, C. Effect of mitochondrial cofactors and antioxidants supplementation on cognition in the aged canine. **Neurobiology of Aging**, v. 37, p. 171-178, 2016.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.
- SOFIC, E. et al. Brain catalase in the streptozotocin-rat model of sporadic Alzheimer's disease treated with the iron chelator-monoamine oxidase inhibitor, M30. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 4, p. 559-564, 2015.
- SOUZA, L. G.; RENNÓ, M. N.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review. **Chemico-biological interactions**, v. 254, p. 11-23, 2016.
- SUETH-SANTIAGO, V.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; LIMA, M. E. F. CYP51: Uma Boa Ideia?. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 539-575, 2015.
- STARLING, D. **Investigação de biomarcadores diagnósticos para a doença de Alzheimer no líquido cefalorraquidiano, na saliva e na mucosa oral**. 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Neurociências). Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2012.
- STEEN, E. et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **Journal Alzheimers Disease**, v. 7, n. 1, p. 63-80, 2005.
- STUDZINSKI, C.; ARAUJO, J.; MILGRAM, N. The canine model of human cognitive aging and dementia: pharmacological validity of the model for assessment of human cognitive-enhancing drugs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 3, p. 489-498, 2005.
- SULTANA, R.; BUTTERFIELD, D. A. Oxidatively Modified GST and MRP1 in Alzheimer's Disease Brain: Implications for Accumulation of Reactive Lipid Peroxidation Products. **Neurochemical Research**, v. 29, n. 12, p. 2215-2229, 2004.
- SULTZER, D. L. et al. Cholinergic Receptor Binding in Alzheimer's Disease and Healthy Aging: Assessment in Vivo with PET Imaging. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, 38 p. 2017.
- TECLES, F.; SUBIELA, S. M.; BERNAL, L. J.; CERÓN, J. J. Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 160, n. 3, p. 242-249, 2000.
- TECLES, F.; PANIZO, C. G.; SUBIELA, S. M.; CERON, J. J. Effects of different variables on whole blood cholinesterase analysis in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 2, p. 132-139, 2002.



- THOMAS, K. D. et al. New quinolin-4-yl-1, 2, 3-triazoles carrying amides, sulphonamides and amidopiperazines as potential antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2503-2512, 2011.
- TODA, T. et al. Apple Procyanidins Suppress Amyloid  $\beta$ -Protein Aggregation. **Biochemistry Research International**, v. 2011, 2011.
- TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.2, p.243- 248, 2004.
- TORRES, L. et al. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 26, n. 1, p. 59-68, 2011.
- TORRES, J. M. Structural insights into cholinesterases inhibition by harmaline  $\beta$ -carbolinium derivatives: A kinetics – molecular modeling approach. **Phytochemistry**, v.81, p. 24-30, 2012.
- TRAVANCINHA, J. **Alterações comportamentais sugestivas de síndrome da disfunção cognitiva em cães geriátricos**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VASCONCELLOS, R. Disfunção cognitiva em cães idosos: avaliação clínica e estratégias terapêuticas. **Clínica Veterinária**, XVII, n. 103, p. 62-70, 2013.
- VENTURA, A. L. M. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.
- VIEGAS JR, C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, p. 655-660, 2004.
- VILAÇA, R. et al. Quercetin protects *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative stress by inducing trehalose biosynthesis and the cell wall integrity pathway. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. e45494, 2012.
- VURAL, H. et al. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 24, n. 3, p. 169-173, 2010.
- WANG, D. M.; LI, S. Q.; WU, W. L.; ZHU, X. Y.; WANG, Y.; YUAN, H. Y. Effects of long-term treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 8, p. 1533-1543, 2014.
- WANG, T. Glutathione S-transferases variants as risk factors in Alzheimer's disease. **Neurological Sciences**, v. 36, n. 10, p. 1785-1792, 2015.
- WEILL, M. et al. Insecticide resistance: a silent base prediction. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. 552-553, 2004.
- WINK, M. Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, p. 3-122, 2000.
- WISEMAN, Frances K. et al. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 564, 2015.

- WISNIEWSKI, H. M. **Aged dogs: an animal model to study beta-protein amyloidogenesis.** Springer Vienna, 1990. p. 151-168.
- WU, C. R.; CHANG, C. L.; HSIEH, P. Y.; LIN, L. W.; CHING, H. Psoralen and isopsoralen, two coumarins of Psoraleae Fructus, can alleviate scopolamine-induced amnesia in rats. **Planta Medica**, v. 73, n. 3, p. 275-278, 2007.
- XIE, S. S. et al. YDesign, synthesis and evaluation of novel tacrine-coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 540-553, 2013.
- YAMAMOTO, Y. et al. Plasma and serum G4 isoenzyme of acetylcholinesterase in patients with Alzheimer-type dementia and vascular dementia. **Annals Clinical Biochemistry**, v. 27, p. 321-326, 1990.
- YAN, D.; ZHANG, Y.; LIU, L.; YAN, H. Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, 6, 32222, 2016.7
- YAO, D. et al. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives as novel acetylcholinesterase inhibitors that attenuate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 68, p. 112-123, 2016.
- ZAFRILLA, P. et al. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1075-1083, 2006.
- ZHENG, W. H. et al. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. **Neuroscience**, v. 115, n. 1, p. 201-211, 2002.
- ZINSER, E.; HARTMANN, T.; GRIMM, M. Amyloid beta-protein and lipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 8, p. 1991-2001, 2007.

## **ANEXOS**

## Anexo A



**UFRRJ**  
Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no  
Uso de Animais  
Instituto de Veterinária



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Enzimologia aplicada a uma nova abordagem de diagnóstico da Disfunção cognitiva Canina e a busca de novos adjuvantes no tratamento desta patologia", protocolada sob o CEUA nº 1916200116, sob a responsabilidade de **Magda Alves de Medeiros e equipe; Soraia John da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 28/04/2016.

We certify that the proposal "Enzymology applied to a new diagnostic approach to Canine cognitive dysfunction and the search for new adjuvants in the treatment of this pathology", utilizing 170 Dogs (males and females), protocol number CEUA 1916200116, under the responsibility of **Magda Alves de Medeiros and team; Soraia John da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 04/28/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 03/2016 a 12/2018      Área: Ciências Fisiológicas

Origem: Não aplicável biotério

Espécie: Cães

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 1 a 17 anos

N: 170

Linhagem: Qualquer raça

Peso: 2 a 40 kg

Resumo: O aumento na expectativa de vida dos animais de companhia tem contribuído para uma elevação no índice de doenças degenerativas de importância médica veterinária. Dentre estas patologias, pode-se citar a Disfunção Cognitiva Canina (DCC), patologia semelhante à Doença de Alzheimer (DA) em humanos, caracterizada por um declínio progressivo na função cognitiva do animal, que acarreta diminuição de resposta a estímulos, deficiências no aprendizado e na memória, entre outros problemas. Desta forma, este projeto tem por objetivo avaliar o uso de duas enzimas de importância neurológica como biomarcadores sanguíneos para esta disfunção. Tem por objetivo ainda analisar em encéfalos de cães normais, o efeito de compostos sintéticos e naturais sobre atividades de enzimas relacionadas com a DCC, visando à busca de tratamentos eficazes para tal disfunção. Através do uso de questionários, 170 pacientes do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRRJ e de clínicas particulares do Rio de Janeiro serão separados em dois principais grupos: cães com sintomatologia de DCC e cães sem esta sintomatologia (controles). Serão realizados exame clínico geral assim com exame neurológico e será considerada a presença de outras patologias comuns na velhice e o uso de medicamentos. Será feita a coleta de sangue destes animais. Parte do sangue será destinado a análise do hematócrito e da bioquímica sanguínea. Outra parte do sangue será centrifugado a 2000 g por 10 minutos para obtenção e separação de plasma e linfócitos com plaquetas. Serão feitas as caracterizações das atividades das enzimas butirilcolinesterase (BChE) no plasma e esterase alvo de neuropatia (neuropathy target esterase [NTE] na porção correspondente aos linfócitos e plaquetas. Será analisada a diferença nestas atividades entre os diferentes grupos, visando observar se há alguma correlação entre a presença da sintomatologia da DCC e a alteração na atividade destas enzimas. Para avaliação do efeito de compostos sobre atividades de enzimas, encéfalos de cães oriundos do setor de Anatomia Patológica da UFRRJ serão processados em homogeneizador mecânico (tipo Potter-Elvehjem) na proporção de 0,25g de cérebro/mL de Tampão Sacarose e HEPES (pH 7,5). O homogeneizado obtido será centrifugado e o sobrenadante será utilizado para análise do efeito de compostos sintéticos e naturais. Os compostos sintéticos serão sintetizados com base na estrutura de moléculas com reconhecida atividade inibitória de enzimas relacionadas com a DA e com a DCC: donepezila, aminopirimidina e amino-hidantoína. E os compostos naturais serão os chás de maçã (*Pyrus malus*), de hortelã (*Mentha piperita*), de boldo (*Peumus boldus*) e chá verde (*Cammelia sinensis*). Todos estes compostos terão seu efeito in vitro avaliado sobre as atividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e 7-secretase.

Local do experimento: Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRRJ e Laboratório de Bioquímica do Instituto de Zootecnia

Seropédica, 14 de outubro de 2016



**UFRRJ**  
Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro


**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**  
Instituto de Veterinária



Prof. Dr. Fabio Barbour Scott  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro

## Anexo B



# Seu cão idoso parece desorientado?

Troca o dia pela noite?  
Está menos ativo ou sociável?  
Esquece comandos ou treinos?

Aqui na UFRRJ estamos desenvolvendo uma pesquisa com cães que apresentem estes sintomas. Mas estamos precisando de **mais voluntários!!!**

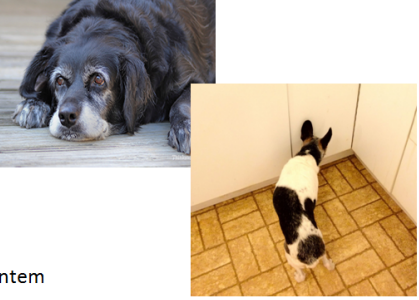
Após o exame clínico o seu cão poderá receber tratamento com acupuntura em sessões semanais caso você deseje.

Se seu cão não apresenta estes sintomas, mas você também quer nos ajudar, entre em contato conosco!


**Poderão participar cães de:**


- Todas as raças
- Ambos os sexos
- Idade a partir de 8 anos


Responsáveis:  
Prof. Dra. Magda Medeiros - DCF  
Prof. Dra. Cristiane Cardoso - DEQUIM  
Soraia John - Doutoranda - PPGQ  
Manoella Tuppan - Mestranda - PPGMV  
Ciro Eugenio Oliveira - Iniciação Científica  
William Almeida - Iniciação Científica





Entre em contato:

(21)988267933 

(21)975555535 

(21)988505119 

soraiajohndasilva@gmail.com  
manutuppanvet@yahoo.com.br



## Anexo C



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Animal n.º \_\_\_\_\_

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA E RESPONSÁVEL:

##### A- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_ Pelagem: \_\_\_\_\_  
Sexo: (M) (F) Castrado? ( ) SIM ( ) NÃO Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

##### B- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL LEGAL:

Nome: \_\_\_\_\_  
Identidade: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_ Sexo: (M) (F) Telefone: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_  
Email: \_\_\_\_\_

#### II – DADOS DA PESQUISA: PROGRAMAS DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA E QUÍMICA

- A- TÍTULO DO PROTOCOLO DA PESQUISA:** “Enzimologia aplicada a uma nova abordagem de diagnóstico da disfunção cognitiva canina e à busca de novos adjuvantes ao tratamento desta patologia”  
**B- TÍTULO DO PROTOCOLO DA PESQUISA:** “Disfunção cognitiva canina: comparação de modelos-diagnósticos e efeitos do tratamento por acupuntura”

##### B- PESQUISADORES:

SORAIA JOHN DA SILVA (DOUTORANDA) - CRISTIANE MARTINS CARDOSO DE SALLES (ORIENTADORA)- MANOELLA TUPPAN DA ROCHA LIMA (MESTRANDA) - CARLA CAROLINE FRANZINI DE SOUZA (DOUTORANDA) - MAGDA ALVES MEDEIROS (ORIENTADORA)

##### C- GRAU DE RISCO DA PESQUISA: SEM RISCO

##### IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- A - Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.  
B - Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo.  
C - Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

##### V. INFORMAÇÕES DE NOMES E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS:

Med. Vet. Soraia J. da Silva	<a href="mailto:soraiajohndasilva@gmail.com">soraiajohndasilva@gmail.com</a>	Cel: (21) 98826 7933
Med. Vet. Manoella T. R. Lima	<a href="mailto:manutuppanvet@yahoo.com.br">manutuppanvet@yahoo.com.br</a>	Cel: (21) 97555 5535
Med. Vet. Carla Caroline. F. Souza	<a href="mailto:carlacarolvet@gmail.com">carlacarolvet@gmail.com</a>	Cel: (21) 98184 6997
Profª Drª. Magda Alves Medeiros	<a href="mailto:magda.medeiros@gmail.com">magda.medeiros@gmail.com</a>	Cel: (21) 99427 8179

##### VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que foi explicado, consinto que meu animal participe do presente Protocolo de Pesquisa.

Local: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável legal

## Anexo D



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Animal n.º \_\_\_\_\_

### FICHA DE CADASTRO

Nome:	Raça:	Pelagem:	Peso:
Sexo:	Idade:		
Nome do tutor:			
Endereço:			
Qual tipo de moradia você vive? ( ) Apartamento ( ) Casa na cidade ( ) Condomínio ( ) Casa com quintal pequeno ( ) Casa com quintal grande ( ) Sítio/Fazenda			
Telefone:			
<b>Antecedentes clínicos:</b>			
Castrado?	Caso afirmativo: com que idade, qual o motivo? Mudou o comportamento? Já teve cria?		
Data da última visita ao veterinário:		Motivo:	
Vacinado? ( ) Sim ( ) Não		Qual(is) vacinas?	
Vermifugado? ( ) Sim ( ) Não			
Carrapatos? ( ) Sim ( ) Não		Pulgas? ( ) Sim ( ) Não	
Faz uso de medicamento(s)? ( ) Sim ( ) Não		Qual (is) e desde quando?	
Já fez alguma cirurgia? ( ) Sim ( ) Não		Qual(is)?	
Possui outros animais? ( ) Sim ( ) Não		Qual(is)? Algum animal doente? Como é o relacionamento entre eles?	
<b>Problema atual:</b>			
<b>Histórico:</b>			
<b>Seu animal possui alteração comportamental anterior ao envelhecimento?</b>			
Se sim, você acha que o aparecimento do problema comportamental foi motivado por algum fato (sons, pessoas estranhas)? ( ) Sim ( ) Não Qual?			



# Anexo E



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



## FICHA COMPORTAMENTAL

Animal no. \_\_\_\_\_

data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Nome:	Raça:	Sexo:	Peso:
Proprietário:			
<b>Aspectos gerais</b>			
Idade do animal adoção/compra: _____ Quanto tempo tem este animal? _____			
Outros donos? ( ) S ( ) N Quantos? _____			
Por que ele foi doado?			
Como você adquiriu este animal? ( ) Encontrado na rua ( ) Abrigo de animais; ( ) Compra em Canil/Pet-shop ( ) Adoção de Amigo; ( ) Adoção; ( ) Outro Qual?			
Por que você adquiriu este animal?			
Você permite que seu cão:( ) Corra livre sem guia na rua; ( ) Corra livre no canil/quintal/casa; ( ) Ande com coleira;( ) Ande sem coleira com sua supervisão; ( ) Fique apenas dentro de casa			
Quantas vezes seu cão caminha ou sai de casa por dia?			
Se seu cão caminha, qual a média de tempo de cada caminhada (em minutos)?			
O que exatamente seu animal come (incluir marcas de ração/alimento humano)? E com que frequência?			
Seu cão tem alergia?			
Houve alguma mudança significativa na sua casa desde que adquiriu este animal?			
Se sim, qual? ( ) Morte de pessoa da família ( ) Morte de animal da família( ) Divórcio( ) Casamento ( ) Nascimento de bebê( ) Criança movida( ) Animais adicionados( ) Mudança de casa( ) Rotina da família mudada ( ) perda ou ganho de emprego ( ) Outros			
Descreva:			
Onde seu animal dorme? ( ) Em cima da sua cama ( ) Embaixo da sua cama( ) Na cama dele no seu quarto ( ) Numa caixa no seu quarto ( ) No chão do seu quarto ( ) Fora do seu quarto porque você não deixa ele entrar( ) Em outro quarto voluntariamente ( ) Numa caixa em outro quarto			
Você brinca com brinquedos ou jogos com seu animal dentro ou fora de casa diariamente? Ou ele brinca sozinho? _____			
Com que frequência? _____			
Como você se prepara para sair de casa quando o animal vai ficar sozinho?( ) Você ignora seu animal; ( ) você busca por ele e se despede ( ) Você demonstra um afeto exagerado por ele?			
O que seu animal faz quando você se prepara para sair?			
Seu cão foi adestrado?( ) S ( ) N Se sim: Como? Onde? Quanto tempo? Idade do início do treinamento?			
Idade do fim do treinamento? Quais os comandos ele obedece?			
Como seu animal reage a estranhos?			
Como seu animal se comporta no veterinário (Agressivo, aceita manipulação, com medo)?			
Seu animal já esteve num hotel para cães? ( ) S ( ) N Como se comportou?			
Seu animal já esteve num banho/tosa para cães? ( ) S ( ) N Como se comporta?			
<b>Animais com histórico de comportamentos estereotipados ou ritualísticos</b>			
Em qual das categorias abaixo o animal se adequa? ( ) Autolesivo (mastigando si próprio, sucção do flanco); ( ) alucinatório (olhar paralisado, ataque a objetos invisíveis);( ) orais (mastigar pedra/sujeira/outros objetos); ( ) locomotor (andar em círculo, correr atrás da cauda); ( ) vocalização (Latido rítmico, latido, rosnar, uivar); ( ) nenhuma das alternativas anteriores. Caso marque esta última opção, pule para o próxima etapa.			

Houve alguma mudança na casa ou algum evento que possa ser associado com o desenvolvimento do comportamento? Qual?
Existe alguma hora do dia que o comportamento se mostra mais ou menos intenso? Que parte do dia?
A presença de uma pessoa/outro animal faz aumentar a intensidade do comportamento? Quem?
Qual a atitude do animal quando realiza o comportamento?( ) Angústia ( ) Medo ( ) Alívio
O animal responde pelo seu nome ou aparenta consciência do seu arredor durante a manifestação do comportamento?
É possível fazer o animal parar a manifestação do comportamento chamando por ele ou utilizando uma restrição física?
Existe um local que o animal prefere para manifestar o comportamento? Qual?
Para distúrbios orais, que tipo de objetos são ingeridos? Seja bem específico.
Existe um padrão de comportamento (após refeição, pela manhã, antes de dormir)? ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual a duração, frequência e características?
Algum evento ou comportamento rotineiro ocorre imediatamente antes ou após o comportamento iniciar?
O comportamento geral do animal mudou de alguma maneira desde que apareceu o comportamento atípico (cão mais afastado, cão mais agressivo)?
O animal teve a sua dieta alterada recentemente?
<b>Histórico de agressividade canina</b>
Seu cão tem histórico de agressividade (já mordeu alguém)? ( ) Sim ( ) Não Obs: Não havendo histórico de agressividade, pular esta etapa.
Quando iniciou?
Há ação legal tomada contra o proprietário decorrente da mordida do seu animal?
Frequência de ocorrência do comportamento indesejável (mordedura): ( ) Diário ( ) Semanal ( ) Mensal ( ) Outros _____
Foi realizada correção e/ou terapia medicamentosa até o momento? ( ) S ( ) N Resultado?
Os pais do animal apresentam comportamento similar?
Você sabe se outros filhotes da mesma ninhada apresentam comportamento similar?

## Anexo F



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Animal n.º \_\_\_\_\_

### Questionário 1

Caro tutor, as perguntas abaixo se referem a alterações que seu cão pode ter em diversos setores da vida dele. Este questionário, desenvolvido por Rofina et al. (2006), pode ser utilizado como ferramenta auxiliar no diagnóstico da **Disfunção Cognitiva Canina**.

		Pontos
<b>Desorientação</b>	1. não apresenta (1) <input type="checkbox"/> 2. em lugares desconhecidos (2) <input type="checkbox"/> 3. em lugares de rotina (4) <input type="checkbox"/> 4. em casa (5) <input type="checkbox"/>	
<b>Ciclo de sono e vigília</b>	1. normal (1) <input type="checkbox"/> 2. dorme mais (2) <input type="checkbox"/> 3- dorme durante o dia e fica acordado à noite (3) <input type="checkbox"/>	
<b>Urina e fezes</b>	1. urina e defeca nos locais de costume (1) <input type="checkbox"/> 2. urina dentro de casa (2) <input type="checkbox"/> 3. urina e defeca em qualquer local da casa (4) <input type="checkbox"/>	
<b>Atividade e interação</b>	1. normais (1) <input type="checkbox"/> 2. diminuídas (2) <input type="checkbox"/> 3. não interage com outros animais ou com o tutor (4) <input type="checkbox"/>	
<b>Apetite</b>	1. normal (1) <input type="checkbox"/> 2. diminuído (2) <input type="checkbox"/> 3. aumentado e com diarreia (3) <input type="checkbox"/> 4- aumentado e sem diarreia (4) <input type="checkbox"/>	
<b>Ingestão de água</b>	1. normal (1) <input type="checkbox"/> 2. diminuída (2) <input type="checkbox"/> 3. aumentada (3) <input type="checkbox"/>	
<b>Comportamento repetitivo</b>	1. sem comportamento repetitivo (1) <input type="checkbox"/> 2. olha "fixo" para o nada (2) <input type="checkbox"/> 3. anda sem rumo (3) <input type="checkbox"/> 4. anda em círculos (4) <input type="checkbox"/>	
<b>Perda da percepção</b>	1. sem alteração (1) <input type="checkbox"/> 2. bate em obstáculos (2) <input type="checkbox"/> 3. tenta passar por espaços estreitos (5) <input type="checkbox"/> 4. tenta passar pelo lado errado da porta (5) <input type="checkbox"/>	
<b>Memória</b>	1. normal (1) <input type="checkbox"/> 2. não reconhece familiares (2) <input type="checkbox"/> 3. não reconhece o tutor após um fim de semana (4) <input type="checkbox"/> 4. não reconhece o tutor diariamente (5) <input type="checkbox"/>	
<b>Mudança na personalidade</b>	1. sem alteração (1) <input type="checkbox"/> 2. agressivo, ou deixou de ser, com outros animais ou crianças (3) <input type="checkbox"/> 3- agressivo, ou deixou de ser, com o dono (4) <input type="checkbox"/>	
<b>Total</b>		

	Outras considerações	
<b>Late/chora mais que antes</b>	sim <input type="checkbox"/>	não <input type="checkbox"/>
<b>Sons baixos</b>	ouve normalmente <input type="checkbox"/>	não ouve normalmente <input type="checkbox"/>

## Anexo G



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Animal nº. \_\_\_\_\_

### Questionário 2

Caro tutor, as perguntas abaixo se referem à **frequência** e **se houve piora** de determinados comportamentos do seu cão. Este questionário, desenvolvido por **Salvin et al. (2011)**, pode ser utilizado como ferramenta auxiliar no diagnóstico da **Disfunção Cognitiva Canina**.

						Pontos
<b>Anda de um lado para outro, anda em círculos ou vaga sem direção ou propósito?</b>	<b>Frequência</b>					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
	<b>Comparando com os últimos 6 meses</b>					
	Muito menos (1) <input type="checkbox"/>	Um pouco menos (2) <input type="checkbox"/>	Sem alteração (3) <input type="checkbox"/>	Um pouco mais (4) <input type="checkbox"/>	Muito mais(5) <input type="checkbox"/>	
<b>Olha fixamente para paredes ou chão?</b>	<b>Frequência</b>					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
	<b>Comparando com os últimos 6 meses</b>					
	Muito menos (1) <input type="checkbox"/>	Um pouco menos (2) <input type="checkbox"/>	Sem alteração (3) <input type="checkbox"/>	Um pouco mais (4) <input type="checkbox"/>	Muito mais(5) <input type="checkbox"/>	
<b>Falha ao reconhecer pessoas ou animais familiares?</b>	<b>Frequência</b>					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
	<b>Comparando com os últimos 6 meses</b>					x3=
	Muito menos (1) <input type="checkbox"/>	Um pouco menos (2) <input type="checkbox"/>	Sem alteração (3) <input type="checkbox"/>	Um pouco mais (4) <input type="checkbox"/>	Muito mais(5) <input type="checkbox"/>	
<b>Tenta ultrapassar paredes ou portas?</b>	<b>Frequência</b>					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
<b>Fica preso atrás de objetos e é incapaz de se locomover?</b>	<b>Frequência</b>					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
<b>Evita ser acariciado?</b>	<b>Frequência</b>					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
<b>Tem dificuldade de encontrar comida deixada no chão?</b>	<b>Frequência</b>					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1-30% das vezes (2) <input type="checkbox"/>	30-60% das vezes (3) <input type="checkbox"/>	61-99% das vezes (4) <input type="checkbox"/>	Sempre (5) <input type="checkbox"/>	
	<b>Comparando com os últimos 6 meses</b>					x2=
	Muito menos (1) <input type="checkbox"/>	Um pouco menos (2) <input type="checkbox"/>	Sem alteração (3) <input type="checkbox"/>	Um pouco mais (4) <input type="checkbox"/>	Muito mais(5) <input type="checkbox"/>	
<b>Urinou ou defecou em locais inapropriados (marque se seu cão não tinha este costume)</b>	<b>Comparando com os últimos 6 meses</b>					
	Muito menos (1) <input type="checkbox"/>	Um pouco menos (2) <input type="checkbox"/>	Sem alteração (3) <input type="checkbox"/>	Um pouco mais (4) <input type="checkbox"/>	Muito mais(5) <input type="checkbox"/>	
<b>Seu cão se mantém ativo?</b>	<b>Comparando com os últimos 6 meses</b>					
	Muito mais (1) <input type="checkbox"/>	Um pouco mais (2) <input type="checkbox"/>	Sem alteração (3) <input type="checkbox"/>	Um pouco menos (4) <input type="checkbox"/>	Muito menos(5) <input type="checkbox"/>	
<b>Total</b>						

## Anexo H

**Tabela 2:** Atividades enzimáticas dos 48 animais participantes do estudo.

<b>ATIVIDADES ENZIMÁTICAS</b>				
<b>NOME</b>	<b>COL(ACh)</b>	<b>COL(BCh)</b>	<b>CAT</b>	<b>GST</b>
<i>GRUPO CONTROLE</i>				
Animal1	8,07	10,07	8,16	7,64
Animal2	4,53	5,87	3,84	6,60
Animal3	2,13	1,60	6,96	9,72
Animal4	3,20	2,73	8,88	2,95
Animal5	2,53	0,78	7,94	8,51
Animal6	8,46	4,47	9,48	6,94
Animal7	3,37	3,84	4,15	4,34
Animal8	4,22	4,90	5,81	6,42
Animal9	8,37	8,32	3,84	9,03
Animal10	5,70	2,69	11,52	7,47
Animal11	4,78	3,11	12,24	6,42
Animal12	4,45	5,60	5,52	3,30
Animal13	1,30	0,92	9,41	4,86
Animal14	2,33	1,98	4,73	7,47
Animal15	0,73	2,57	5,76	8,16
Média	4,28	3,96	7,22	6,66
Desvio-padrão	2,48	2,65	2,72	2,01
<i>GRUPO DE RISCO</i>				
Animal16	4,07	2,47	9,36	5,56
Animal17	2,13	3,07	7,20	7,12
Animal18	4,36	5,33	9,53	6,42
Animal19	2,05	0,64	4,87	3,82
Animal20	2,15	4,24	3,94	9,03
Animal21	3,49	1,42	9,07	6,42
Animal22	2,27	7,40	NA	NA
Animal23	1,20	2,33	NA	NA
Animal24	2,80	4,47	NA	NA
Média	2,72	3,49	7,33	6,40
Desvio-padrão	1,05	2,10	2,43	1,72
<i>GRUPO DCC LEVE</i>				
Animal25	4,80	4,73	5,88	8,68
Animal26	5,37	4,39	I	9,55
Animal27	4,36	5,45	6,07	9,03
Animal28	3,49	1,07	8,35	6,94
Animal29	3,11	1,37	8,66	6,94
Animal30	2,19	2,73	3,48	NA
Animal31	0,47	1,00	9,60	NA

Animal32	3,00	6,73	7,44	NA
Animal33	3,13	5,14	8,74	NA
Animal34	2,45	1,53	6,74	NA
Média	3,24	3,41	7,22	8,23
Desvio-padrão	1,41	2,12	1,89	1,22
<i>GRUPO DCC MODERADA</i>				
Animal35	4,13	4,07	9,60	8,16
Animal36	4,13	5,07	2,64	9,03
Animal37	3,73	6,67	12,79	10,42
Animal38	3,13	2,31	7,44	10,07
Animal39	1,29	2,12	8,78	5,90
Animal40	3,19	4,36	6,34	NA
Média	3,27	4,10	7,93	8,72
Desvio-padrão	1,06	1,72	3,40	1,81
<i>GRUPO DCC AVANÇADA</i>				
Animal41	4,07	5,54	5,52	10,07
Animal42	1,80	0,93	6,48	9,55
Animal43	1,32	0,89	4,87	I
Animal44	2,43	2,97	5,26	14,58
Animal45	2,55	2,78	2,74	NA
Animal46	6,57	2,78	5,59	NA
Animal47	5,56	7,66	7,13	5,21
Animal48	3,21	3,16	6,94	NA
Média	3,44	3,34	5,57	9,85
Desvio-padrão	1,84	2,27	1,40	3,83

COL (ACh): colinesterases utilizando substrato acetilcolina (kU/L). COL (BCh): colinesterases utilizando substrato butirilcolina (kU/L). CAT: catalase (kU/mL). GST: glutationa S-transferase (U/L). I: Inconclusivo. NA: Não avaliado.

# Anexo I

