



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

LUIZ WALDEMAR DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA MEMANTINA E EPIGALOCATEQUINA-GALATO (EGCG) EM
PARÂMETROS INDICATIVOS DE SÍNDROME DE DOWN EM CAMUNDONGOS
TS65DN, COMO MODELO PRÉ-CLÍNICO: REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-
ANÁLISE**

Presidente Prudente - SP
2023



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

LUIZ WALDEMAR DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA MEMANTINA E EPIGALOCATEQUINA-GALATO (EGCG) EM
PARÂMETROS INDICATIVOS DE SÍNDROME DE DOWN EM CAMUNDONGOS
TS65DN, COMO MODELO PRÉ-CLÍNICO: REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-
ANÁLISE**

Tese de Doutorado apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia e Saúde Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

Presidente Prudente – SP
2023

636.089
O48e

Oliveira, Luiz Waldemar de

Efeitos da memantina e epigallocatequina-GALATO (EGCG) em parâmetros indicativos de síndrome de down em camundongos ts65dn, como modelo pré-clínico: revisão sistemática com meta-análise / Luiz Waldemar de Oliveira - Presidente Prudente, 2023.

94f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

1. EGCG. 2. Memantina. 3. Ts65Dn. 4. Síndrome de Down. I. Título.

LUIZ WALDEMAR DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA MEMANTINA E EPIGALOCATEQUINA-GALATO (EGCG) EM
PARÂMETROS INDICATIVOS DE SÍNDROME DE DOWN EM CAMUNDONGOS
TS65DN, COMO MODELO PRÉ-CLÍNICO: REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-
ANÁLISE**

Tese de Doutorado apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 27 de Setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste - Presidente Prudente - SP

Prof.a Dr.a Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE - Presidente Prudente - SP

Prof.a Dr.a Rogéria Keller
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE - Presidente Prudente - SP

Prof.a Dr.a Rita de Cássia Nunes Ross
Faculdade da Alta Paulista - FAP – Tupã - SP

Prof.a Dr.a Dalva Pazzini Grion
UniFAI - Centro Universitário de Adamantina – Adamantina - SP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Antônio de Oliveira e Maria de Lourdes Chiampi Oliveira; que sempre estiveram ao meu lado me apoiando;

Aos meus filhos Anna Luiza Rauseo Oliveira, Luiz Waldemar de Oliveira Junior, Guilherme Rauseo de Oliveira e Lourdes Maria da Silva Oliveira; meus eternos amores;

A minha esposa Vanessa da Silva Santos, o “morzão” da minha vida;

Em especial ao Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, um amigo, grande pesquisador e orientador dentro da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE.

AGRADECIMENTOS

Aos proprietários da Universidade do Oeste Paulista e em especial ao Pró-reitor Prof. Dr. José Eduardo Creste pelo apoio e credibilidade.

Ao meu amigo e Orientador, Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, pelo comprometimento, esforço, dedicação, competência, inteligência, compreensão, bom humor e conselhos que soube sempre usar nas horas tensas e à paciência dispensadas para comigo.

À graduanda da Faculdade de Medicina, Laura Franco Rodrigues, bolsista do PIBIC/CNPq por ter ajudado e participado ativamente para que esses estudos tivessem êxito;

Ao Prof. Dr. Heliard Rodrigues dos Santos Caetano pela colaboração e disposição a ajudar;

Ao Prof. Dr. Rogério Giuffrida pela colaboração nas estatísticas e estar sempre disposto a compartilhar seu conhecimento científico;

Aos professores e principalmente a coordenação, Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho e Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém, do Programa Ciência Animal;

A Sra. Keid Ribeiro Krüger pela sempre presteza e amizade;

A todos que direta e indiretamente colaboraram de alguma forma para a produção deste trabalho.

**“Não pense que a vitória está perdida,
Tenha fé em Deus, tenha fé na vida,
Tente outra vez.”**

Raul Seixas.

**“Mas se você achar que eu estou derrotado
Saiba que ainda estão rolando os dados,
Porque o tempo, o tempo não para.”**

Cazuza

RESUMO

Efeitos da memantina e epigallocatequina-galato (EGCG) em parâmetros indicativos de síndrome de down em camundongos TS65DN, como modelo pré-clínico: revisão sistemática com meta-análise

Contexto: A síndrome de Down (SD) é um distúrbio genético causado pela presença total ou parcial de uma terceira cópia do cromossomo 21 e que acarreta alterações físicas e mentais. Em camundongos Ts65Dn, o fármaco epigallocatequina-galato (EGCG) e a memantina demonstraram efeitos benéficos em parâmetros comportamentais, motores, memória e moleculares, porém os resultados dos estudos são conflitantes. **Objetivo:** O objetivo da presente tese foi revisar sistematicamente estudos que avaliaram os efeitos de do EGCG e memantina em camundongos Ts65Dn, como modelo experimental, visando aumentar o nível de evidência em parâmetros associados a essa síndrome. **Metodologia:** As buscas foram realizadas nas bases de dados: “Medline”, “Embase”, “Pubmed”, “Web of Science”, “ScienceDirect”, “Scielo”, “Scopus” e “Google Scholar”, utilizando as palavras-chave pertinente a cada uma das substâncias administradas. As buscas foram realizadas separadamente para cada substância e incluídos no Rayyan (um aplicativo web e móvel para revisões sistemáticas) e após triagem detalhada, os estudos que preencheram os critérios de inclusão foram selecionados, extraídos os dados, divididos aleatoriamente entre os grupos controle e tratamento e os resultados primários foram meta-analisados. **Resultados:** Os resultados evidenciaram benefícios do EGCG e memantina. **Conclusão:** O EGCG e memantina demonstraram efeitos benéficos em parâmetros comportamentais, motores, memória e moleculares, entretanto, mais estudos primários são necessários para aumentar o nível de evidência.

Palavras-chave: EGCG, Memantina, Ts65Dn, síndrome de Down, camundongos

ABSTRACT

Effects of memantine and epigallocatechin-gallate on parameters indicative of down syndrome in TS65DN mice as a preclinical model: systematic review with meta-analysis

Background: Down syndrome (DS) is a genetic disorder caused by the total or partial presence of a third copy of chromosome 21, which causes physical and mental alterations. In Ts65Dn mice, the drug epigallocatechin gallate (EGCG) and memantine showed beneficial effects on behavioral, motor, memory and molecular parameters, but the results of the studies are conflicting. **Objective:** The aim of this thesis was to systematically review studies that evaluated the effects of EGCG and memantine in Ts65Dn mice, as an experimental model, aiming to increase the level of evidence on parameters associated with this syndrome. **Methodology:** Searches were carried out in the following databases: “Medline”, “Embase”, “Pubmed”, “Web of Science”, “ScienceDirect”, “Scielo” e “Google Scholar” and Google Scholar, using the keywords relevant to each of the administered substances. Searches were performed separately for each substance and included in Rayyan (a web and mobile application for systematic reviews) and after detailed screening, studies that met the inclusion criteria were selected, data extracted, randomly divided between control and treatment groups and primary outcomes were meta-analyzed. **Results:** The results showed some beneficial results from EGCG and memantine. **Conclusion:** EGCG and memantine demonstrated beneficial effects on behavioral, motor, memory and molecular parameters, however, more primary studies are needed to increase the level of evidence.

Keywords: EGCG, Memantine, Ts65Dn, Down syndrome, mice.

SUMÁRIO

1	ARTIGO 1.....	11
2	ARTIGO 2.....	42
3	PARECER DO COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)-UNOESTE.....	80
4	NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA: ARTIGO 1 e 2.....	81

1 ARTIGO 1

EFEITOS COMPORTAMENTAIS, MOTORES, MEMÓRIA E APRENDIZADO E CONCENTRAÇÃO DA EPIGALOCATEQUINA-GALATO (EGCG) ADMINISTRADO EM CAMUNDONGOS TS65DN, COMO MODELO PRÉ-CLÍNICO: REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE

Luiz Waldemar de Oliveira^a; Hermann Bremer-Neto^a. Heliard Rodrigues dos santos Caetano^a

^a Departamento de Ciências Funcionais, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente, Universidade do Oeste Paulista, Rua José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Resumo

Introdução: A síndrome de Down (SD) é um distúrbio genético causado pela presença total ou parcial de uma terceira cópia do cromossomo 21 e que acarreta alterações morfológicas e mentais. Em camundongos Ts65Dn, o flavonóide epigallocatequina-galato (EGCG) demonstrou restaurar o desenvolvimento do hipocampo e resgatar o aprendizado e memória, porém os resultados são conflitantes.

Objetivo: O objetivo deste projeto foi realizar uma revisão sistemática com metanálise para avaliar os efeitos da EGCG em parâmetros comportamentais, coordenação motora e aprendizado e a quantificação da proteína e atividade da enzima dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A), em camundongos Ts65Dn, com SD, como modelo experimental.

Metodologia: As buscas foram realizadas nas bases eletrônicas “Medline”, “Embase”, “Pubmed”, “Web of Science”, “ScienceDirect”, “SciELO” e “Google Scholar” disponíveis na Internet usando as palavras-chave EGCG, Epigallocatequina-galato, Ts65Dn, síndrome de Down, camundongos, palavras aceitas como Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e Medical Subject Headings (MeSH) e sem restrição de datas, idioma de publicação ou categoria, incluindo artigos completos, resumos e capítulos de livros. As etapas de revisão, filtragem e abastecimento da base de dados foram realizadas aos pares e em caso de dúvida um terceiro foi requisitado, para seleção e triagem dos artigos utilizamos o aplicativo Rayyan. Usamos o software RevMan 5.4 para a realização dos cálculos da meta-análise. A significância foi definida em $p < 0,05$.

Resultados: Inicialmente, 535 estudos foram encontrados e após aplicação dos critérios de exclusão e inclusão, sete estudos foram incluídos na análise quantitativa, contendo 250 camundongos Ts65Dn, sendo tratados 123 animais com EGCG e 127 animais controle. Os parâmetros meta-analiticamente analisados foram: labirinto aquático de Morris; reconhecimento de objetos novos; trave de equilíbrio: diâmetros de 6, 9 e 12 mm; campo quadrado concêntrico multivariado: tomada de risco e avaliação de risco; concentração de proteína DYRK1A e atividade da enzima DYRK1A em áreas encefálicas: córtex cerebral; cerebelo; e hipocampo. Os resultados revelaram efeito benéfico ($p < 0,05$) do fármaco nos parâmetros: reconhecimento de

objetos novos; avaliação de risco no campo concêntrico multivariado; e trave de equilíbrio com 12 mm de diâmetro.

Conclusão: Os resultados fornecem evidências de efeitos benéficos da administração de EGCG em camundongos Ts65Dn, como modelo pré-clínico síndrome de Down, em parâmetros comportamentais, função motora e memória. Ensaios rigorosos com poder estatístico suficiente são urgentemente necessários e que possam aumentar o nível de evidência e trazer luz para a utilização desse princípio ativo na síndrome de down

Palavras-chave: EGCG, Ts65Dn, síndrome de Down, camundongos

1. Introdução

A síndrome de Down (SD) é uma desordem genética causada pela presença total ou parcial da terceira cópia do cromossomo 21 humano (Hsa21), é a causa mais comum de deficiência intelectual (DI) em humanos (HASLE, CLEMMENSEN, MIKKELSEN, 2000). A SD continua a ser o distúrbio cromossômico mais comum e a cada ano, cerca de 6.000 bebês nascem com essa síndrome, o que representa cerca de 1 em cada 700 bebês nascidos (MAI et al., 2019). Essa enfermidade está associada a comprometimento cognitivo e malformações congênitas e que afeta a maioria dos sistemas de órgãos, incluindo cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, nervoso (reduções nos tamanhos do córtex pré-frontal, cerebelo, hipocampo, amígdala e tronco cerebral), músculo esquelético, imunológico, hematológico, endócrino, oftálmico e auditivo. Além disso, as crianças apresentam macroglossia, defeitos do coxim endocárdico, atresia duodenal, instabilidade atlantoaxial, estenose subglótica e risco elevado de leucemia (SINTON; COOPER; WILEY, 2022)

Embora as últimas décadas de pesquisa sobre SD tenham produzido avanços significativos, agora há a necessidade de avaliar as características do distúrbio que permanecem indescritíveis e planejar a próxima fase de investigação sobre como o cérebro humano responde à triplicação do Hsa21. Vários dos efeitos da trissomia 21 são atualmente controlados clinicamente, como defeitos cardíacos e do trato gastrointestinal, entretanto, a característica mais penetrante da SD, a deficiência intelectual, até agora não foi suficientemente compreendida para desenvolver terapias bem-sucedidas. Isso se deve em parte à complexidade do cérebro humano e sua inacessibilidade a estudos longitudinais invasivos, mas também ao fato de que cada pessoa com SD é um indivíduo com sua própria genética de fundo, exposição ambiental e expressão de características de SD (KLEIN; HAYDAR, 2022).

Historicamente, o modelo de camundongo mais amplamente utilizado e, portanto, melhor caracterizado de SD, é o camundongo trissômico Ts65Dn e como sobrevive até a idade adulta, permitindo estudos pós-natais pela primeira vez em um modelo de camundongo. Esse modelo animal é o resultado de uma translocação da região distal do MMU16 para a região centromérica do cromossomo 17 do camundongo (MMU17) e como a maioria dos indivíduos com SD, esse animal tem um cromossomo marcador extra livremente segregado que carrega aproximadamente 119 genes triplicados de MMU16 (DUCHON et al.,

2011). Comportamentalmente, o Ts65Dn parece capturar muitas das características do SD, incluindo atrasos no desenvolvimento e déficits de aprendizado e memória (SHAW et al., 2020).

O epigallocatequina-galato (EGCG), com alta concentração na planta *Camellia sinensis* (planta do chá verde e do chá branco) o EGCG tem efeitos inibitórios em muitos aspectos de alterações anormais, como antioxidante, anticâncer, anti-inflamatório, anticolagenase e efeitos antifibrose, aparecendo em sua ampla gama funcional. Pode-se especular que o EGCG, até certo ponto, tem o efeito de proteger órgãos ou tecidos de uma série de doenças. Além disso, o EGCG tem efeito promocional na osteogênese (JIN et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2011). Embora as pesquisas sobre EGCG ainda estejam em andamento, acompanhadas de algumas controvérsias, é mais provável que o EGCG seja benéfico para a saúde (CHU et al., 2017).

Um estudo pioneiro sugerindo um possível benefício do EGCG na SD examinou o efeito desse fármaco no tecido hipocampal de camundongos Ts65Dn (XIE et al., 2008) e os resultados de sua administração demonstrou resgatar níveis de potenciação de longo prazo (LTP) na sinapse colateral de Schaffer-CA1, sugerindo um potencial benefício do EGCG no resgate da memória na SD, assim como restaurou a eficiência da fosforilação oxidativa e a biogênese mitocondrial, além de melhorar a proliferação, o que sugere que o EGCG têm potencial de melhorar as funções mitocondriais em células progenitoras neurais (NPCs) isoladas do hipocampo de camundongos Ts65Dn (VALENTI et al., 2016).

Entretanto, o tratamento com EGCG falhou em melhorar os déficits cognitivos e também produziu vários efeitos prejudiciais no esqueleto, reduzindo significativamente a atividade da quinase nos fêmures, mas não no córtex cerebral, cerebelo ou hipocampo. Ao contrário do esperado, camundongos Ts65Dn de 9 semanas de idade exibiram uma diminuição nos níveis de proteína DYRK1A na análise de Western blot no cerebelo. A falta de efeitos comportamentais terapêuticos benéficos e efeitos esqueléticos potencialmente prejudiciais de EGCG encontrados em camundongos Ts65Dn enfatizam a importância de identificar dosagens de EGCG que melhoram de forma confiável os fenótipos de SD e vincular esses efeitos às ações de EGCG (ou suplementos contendo EGCG) em alvos específicos em cérebro e osso (STRINGER et al., 2017). Portanto, os efeitos da administração desse fármaco são conflitantes e justifica-se a necessidade da realização de uma revisão sistemática em animais (camundongos Ts65Dn), para trazer luz a essas questões e incentivar novos estudos controlados e randomizados em humanos em relação a essa intervenção.

Esta revisão sistemática com meta-análise tem como objetivo compilar estudos dos efeitos da administração da EGCG em camundongos Ts65Dn, como modelo da SD, em parâmetros comportamentais, coordenação motora e aprendizado e concentração de proteína DYRK1A e atividade da quinase DYRK1A. Além disso, aumentar o nível de evidência e incentivar ensaios clínicos randomizados para avaliar a eficácia dessa droga na melhora das afecções desencadeadas pela SD em humanos.

2. METODOLOGIA

A revisão sistemática deste estudo foi conduzida de acordo com as recomendações do Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (MOHER et al., 2010), para responder à pergunta de pesquisa: “Os parâmetros comportamentais, coordenação motora e aprendizado e concentração e atividade enzimática de DYRK1A em camundongo Ts65Dn, modelo experimental de síndrome de Down, são influenciados pela administração do fármaco EGCG?”

O protocolo foi registrado na plataforma OSF (Open Science Framework) (<https://osf.io>).

2.1 Estratégia de Pesquisa

Os dados e artigos utilizados na revisão sistemática foram obtidos até o mês de maio de 2023. As buscas foram realizadas nas bases eletrônicas de dados científicos “Medline”, “Embase”, “Pubmed”, “Web of Science”, “ScienceDirect”, “Scielo” e “Google Scholar” disponíveis na Internet. Para as buscas, foram utilizadas as palavras-chave epigallocatequina-galato, EGCG, Ts65Dn, síndrome de down, camundongos, que são aceitos como Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e Medical Subject Headings (MeSH). Estes termos foram utilizados em conjunto nos idiomas inglês e português. Para tornar as pesquisas mais abrangentes, nesta fase, todos os resultados obtidos foram analisados sem restrição de datas, idioma de publicação ou categoria, incluindo artigos completos, resumos e capítulos de livros.

2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os trabalhos que continham as palavras-chave foram selecionados e analisados de maneira independente por dois pesquisadores do grupo (Oliveira, L. W. e Caetano, H. R. S.), e em caso de discordância, um terceiro autor foi consultado (Bremer Neto, H.). Registros duplicados e trabalhos que não estavam relacionados aos objetivos propostos foram manualmente excluídos após análise dos títulos e/ou resumos. Foram selecionados trabalhos completos que estudaram o seguinte P.I.C.O.: (1) População: camundongos machos Ts65Dn, (2) Intervenção: administração de EGCG por via oral; (3) Controle: camundongos machos Ts65Dn e não administrado EGCG; (4) Desfechos: labirinto aquático de Morris; reconhecimento de objetos novos; trave de equilíbrio: diâmetros de 6, 9 e 12 mm; campo quadrado concêntrico multivariado (MCSF) - tomada de risco; e avaliação de risco; e concentração e atividade da enzima DYRK1A em áreas encefálicas: córtex cerebral, cerebelo e hipocampo. Ensaio clínico em outras espécies, estudos-piloto, artigos de revisão e trabalhos que não abordaram o objetivo desta revisão sistemática foram excluídos.

2.3 Seleção dos artigos

A seleção dos artigos foi realizada conforme as recomendações do PRISMA (Figura 1). Essa

seleção foi realizada de forma independente por dois pesquisadores (Oliveira, L. W. e Caetano, H. R. S.) baseado nos critérios de inclusão e exclusão, e consultado um terceiro autor na dúvida (Bremer Neto, H.). Utilizando o Rayyan os artigos duplicados foram eliminados. Ademais, foi realizada ainda uma busca nas sessões de referências bibliográficas dos artigos selecionados com o intuito de localizar pesquisas adicionais que contemplassem os critérios de inclusão propostos.

2.4 Extração de dados.

Depois de aplicado os critérios de inclusão, foi elaborada uma planilha com os dados de cada artigo selecionado na etapa anterior a qual contém: autor/ano de publicação, espécie/sexo, modelo animal, idade dos animais, tratamentos/número de animais, droga, fabricante, via de administração, duração em dias e parâmetros analisados. Esses dados foram dispostos na Tabela 1.

2.5 Parâmetros de Interesse

Para os objetivos dessa revisão sistemática com meta-análise foi definido labirinto aquático de Morris (WMW), reconhecimento de objetos novos (NOR), trave de equilíbrio (BB), campo quadrado concêntrico multivariado (MCSF) - tomada de risco; e avaliação de risco, concentração e atividade enzimática de DYRK1A foram definidos como parâmetros de relevância primária para os objetivos desta meta-análise e estão descritos na Tabela 2.

2.6 Qualidade dos Estudos e Risco de Viés

A qualidade dos estudos e o risco de viés foi analisada de maneira independente por dois autores (Oliveira, L. W. e Caetano, H. R. S.) e o intuito foi estabelecer consistência e evitar discrepâncias na avaliação da qualidade metodológica no domínio da experimentação animal.

Para a qualidade dos estudos baseou-se no Collaborative Approach to Meta-analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies checklists (MACLEOD et al., 2015). O risco de viés foi analisado com base nos Instrumentos de Avaliação de Risco de Viés e Outros Critérios Metodológicos de Estudos Animais Publicados. Caso houvesse alguma divergência entre os autores um terceiro, revisor (Bremer-Neto, H.), foi chamado para resolver o impasse. Esses dois instrumentos são responsáveis pelo estabelecimento da qualidade desses artigos, variando de 0 a 7 pontos, sendo parte se seus critérios: (1) cálculo do tamanho da amostra; (2) alocação aleatória para tratamento; (3) condições de criação; (4) avaliação cega dos resultados; (5) cumprimento das regulamentações de bem-estar animal; (6) divulgação de conflitos de interesse; e (7) publicação revisada por pares (KRAUTH; WOODRUFF; BERO, 2013; MACLEOD et al., 2015). A validação da qualidade dos estudos incluídos nessa meta-análise está descrita na Tabela 3.

2.7 *Análise Estatística*

Usamos o software RevMan 5.4 para a realização dos cálculos da meta-análise. Para a análise da variância utilizamos as médias e desvios padrões dos resultados de cada estudo para comparar os dados encontrados. A heterogeneidade foi calculada usando o teste do Q2 e I2, a significância foi definida em $p < 0,10$ ou $I^2 > 50\%$. Foram analisados os efeitos randômicos dos tratamentos. O valor de $P < 0,05$ foi adotado como estatisticamente significativo.

3. Resultados

Ao total foram encontrados 535 estudos, incluídos artigos completos e de revisão, resumos ou capítulos de livros que atendiam as palavras-chaves da busca bibliográfica e após a eliminação das duplicatas, restaram 374 estudos. Após avaliação dos títulos e resumos, foram excluídos capítulos de livros, livros, artigos de revisão, teses/dissertações e resumos e 47 estudos foram potencialmente escolhidos para avaliação posterior. Após leitura e análise completa, sete estudos preencheram os critérios de inclusão propostos (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LA TORRE et al., 2014; DE TOMA et al., 2019; GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2015, 2017; YIN et al., 2017). A seleção da literatura, seleção dos estudos e razão de exclusão são dispostos no diagrama de fluxo do PRISMA (Figura 1).

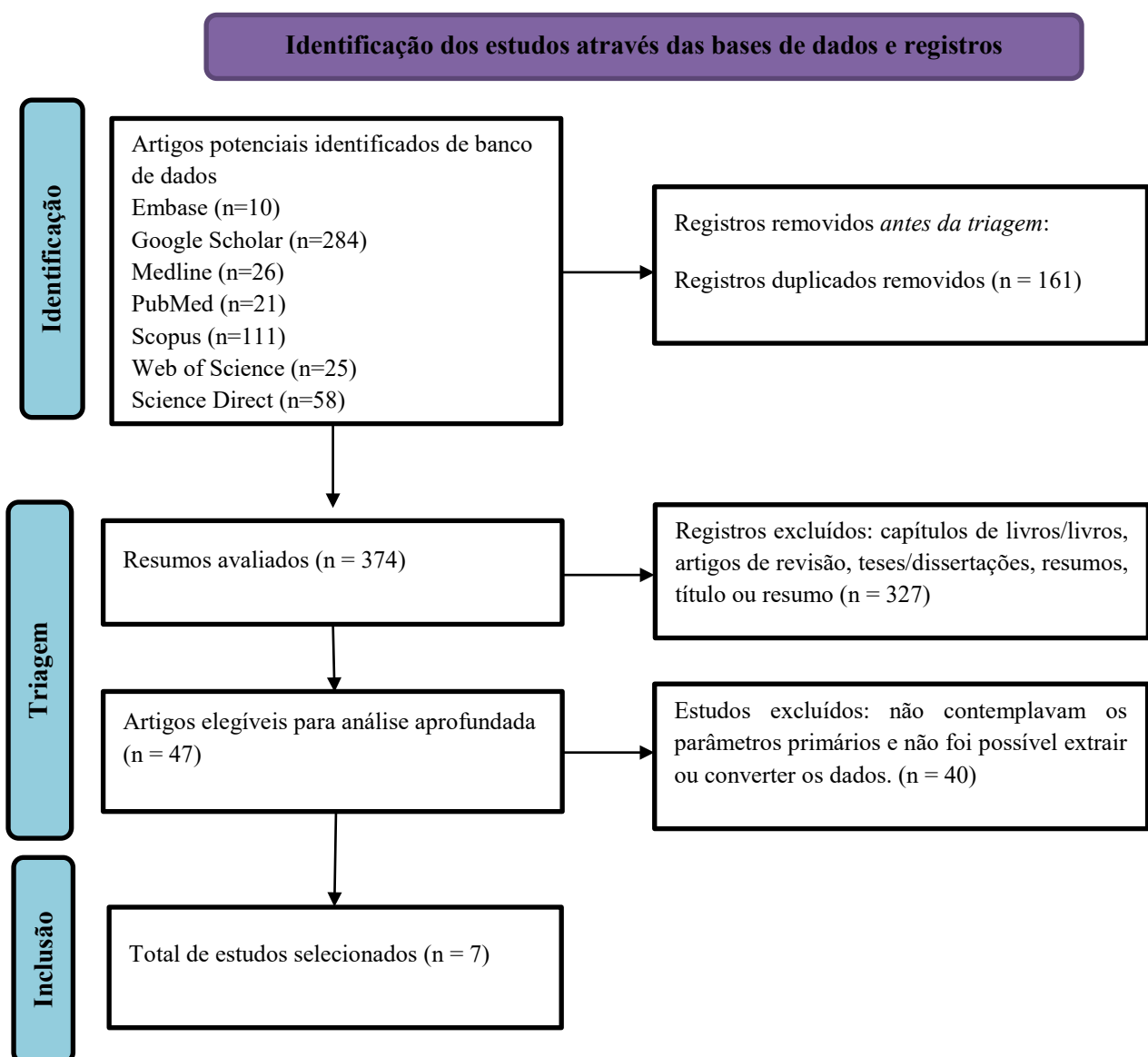


Figura 1 Fluxograma do PRISMA mostrando as etapas do processo de seleção da literatura e os motivos de exclusão.

3.1 Características dos estudos incluídos nas meta-análises

O tempo de duração dos estudos incluídos variou de 21 dias a 150 dias e foi utilizado um total de 250 camundongos machos (127 no grupo tratamento com EGCG e 123 no grupo controle). Os artigos selecionados e suas respectivas doses e tempo de tratamento, ano de publicação estão apresentados na Tabela

Tabela 1. Sumário das características dos estudos incluídos na revisão sistemática.

Estudos	Modelo animal/Sexo	Idade dos animais (dias)	Tratamentos/Número de animais	Concentração fármaco	Dose	Fabricante
De la Torre et al. (2014)	Camundongos Ts65Dn / Macho	90 a 120	Controle = 14 Tratamento = 14	extrato de chá verde com 326,25 mg de EGCG (solução final de 90 mg/mL)	2–3 mg por dia, diluído em água	Life Extension®, Fort Lauderdale, FL, USA)
Stringer et al. (2015)	Camundongos Ts65Dn / Macho	Experimento 1 24 a 45	Experimento 1 Controle = 18 Tratamento = 22	EGCG, 95% de pureza	15,4 mg / peso vivo/dia, diluído em água	Sigma-Aldrich, Código 989-51-5
		Experimento 2 24 a 73	Experimento 2 Controle = 10 Tratamento = 8			
Stringer et al. (2017)	Camundongos Ts65Dn / Macho	24 a 66	Controle = 13 Tratamento = 15	EGCG, 95% de pureza	50,0 mg/peso vivo/dia diluído em água	Sigma-Aldrich, Código 989-51-5
Yin et al. (2017)	Camundongos Ts65Dn / Macho	0 a 150	Controle = 12 Tratamento = 13	extrato de chá verde com 326,25 mg de EGCG (solução final de 90 mg/mL)	~3 mg por dia, diluído em água	Life Extension®, Fort Lauderdale, FL, USA)
De Toma et al. (2019)	Camundongos Ts65Dn / Macho	60 - 90	Controle = 18 Tratamento = 18	extrato de chá verde com 326,25 mg de EGCG (solução final de 90 mg/mL)	~3 mg por dia, diluído em água	Life Extension®, Fort Lauderdale, FL, USA)
Alemany-González et al. (2020)	Camundongos Ts65Dn / Macho	90 - 120	Controle = 11 Tratamento = 10	extrato de chá verde com 326,25 mg de EGCG (solução final de 90 mg/mL)	2–3 mg por dia, diluído em água	Life Extension®, Fort Lauderdale, FL, USA)
Goodlett et al., (2020)	Camundongos Ts65Dn / Macho	42 - 68	Controle = 31 Tratamento = 23	EGCG, 95% de pureza	200 mg / peso vivo/dia diluído em água	Sigma-Aldrich, Código 989-51-5

*EGCG (Epigallocatequina-galato)

3.2 Eficácia da administração da epigallocatequina-galato nos parâmetros primários

Os parâmetros reconhecimento de objetos novos (NOR), labirinto aquático de Morris (WMW), trave de equilíbrio (BB), espessuras de 6; 9 e 12 mm, campo quadrado concêntrico multivariado: tomada de risco; e avaliação de risco e concentração de proteína DYRK1A e atividade da enzima DYRK1A em áreas encefálicas foram eleitos para esta meta-análise, sendo os dados expressos com clareza, o que permitiu a extração com segurança dos valores para serem meta-analisados. Outros parâmetros não puderam ser meta-analisados, pois foram expressos de outras formas, não sendo possível incluí-los como parâmetros primários (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros avaliados dos estudos incluídos

Estudos	Duração do experimento (dias)	Parâmetros avaliados
De la Torre et al. (2014)	30	Reconhecimento de objetos novos (NOR).
Stringer et al. (2015)	Experimento 1 = 21 Experimento 2 = 49	Reconhecimento de objetos novos (NOR); Labirinto aquático de Morris (WMW); Trave de Equilíbrio: 9 e 12 mm. Labirinto em T; Atividade locomotora
Stringer et al. (2017)	42	Labirinto aquático de Morris (WMW); Trave de Equilíbrio: 6, 9 e 12 mm; Campo quadrado concêntrico multivariado(MCSF): tomada de risco; avaliação de risco; concentração da Proteína DYRK1A em áreas encefálicas; Atividade quinase da proteína DYRK1A em áreas encefálicas. Campo quadrado concêntrico multivariado(MCSF): Entradas totais, Comportamento exploratório e Busca de abrigo
Yin et al. (2017)	150	Labirinto aquático de Morris (WMW); concentração da Proteína DYRK1A no córtex cerebral
De Toma et al. (2019)	30	Reconhecimento de objetos novos (NOR)
Alemaný-González et al. (2020)	30	Reconhecimento de objetos novos (NOR).
Goodlett et al. (2020)	26	Labirinto aquático de Morris (WMW); Trave de Equilíbrio: 6, 9 e 12 mm; Campo quadrado concêntrico multivariado(MCSF): tomada de risco; avaliação de risco; concentração da Proteína DYRK1A em áreas encefálicas; Atividade quinase da proteína DYRK1A em áreas encefálicas. Campo quadrado concêntrico multivariado(MCSF): Entradas totais, Comportamento exploratório e Busca de abrigo.

*Em negrito estão evidenciados os parâmetros primários.

A meta-análise dos resultados relativos ao reconhecimento de objetos novos (NOR) em camundongos machos TS65Dn, modelo experimental SD, demonstrou que a administração oral da EGCG, melhorou significativamente ($p=0,00001$) esse parâmetro, quando comparado ao grupo controle (Figura 2).

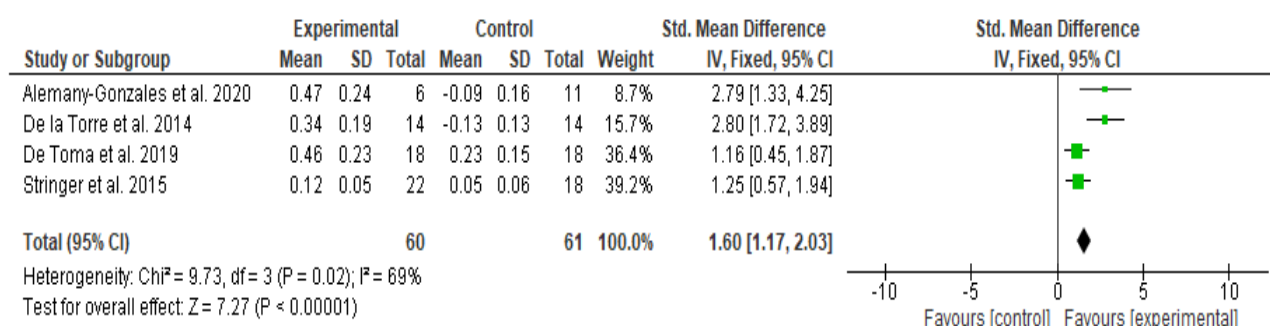


Figura 2. Forest Plot dos estudos incluídos comparando os resultados da avaliação de reconhecimento de objetos novos (NOR) (média $\pm$ SEM) dos grupos experimentais: camundongos machos Ts65Dn, tratados com EGCG, na concentração 2-3mg/dia (Alemany-Gonzales et al., 2020), 2-3 mg/dia (De la Torre et al., 2014), aproximadamente 3mg/dia (De Toma et al., 2019) e 15,4 mg por quilo de peso vivo ao dia (Stringer et al., 2015) e do controle: camundongos machos Ts65Dn não tratados com EGCG.

A meta-análise dos resultados relativos ao labirinto aquático de Morris (MWM) – tempo gasto no alvo, evidenciou que a administração de EGCG nos camundongos machos Ts65Dn, modelo experimental SD, não diferiu do grupo controle ($p=0,82$) (Figura 3).

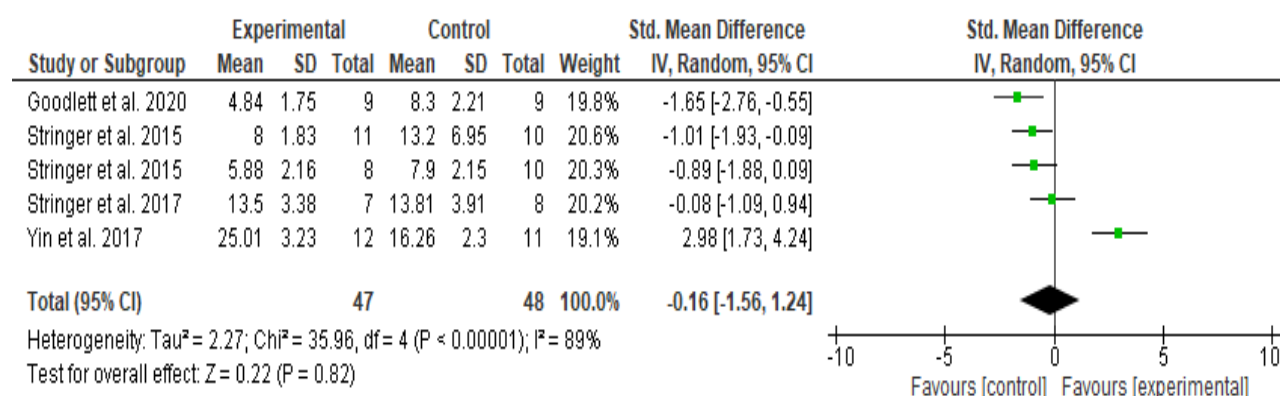


Figura 3. Forest Plot dos estudos incluídos comparando os dados extraídos do parâmetro labirinto aquático de Morris (MWM) (média $\pm$ SD) dos grupos experimentais: camundongos machos Ts65Dn administrado EGCG na concentração de 200 mg por quilo de peso vivo por dia (GOODLETT et al., 2020), 15,4 mg de EGCG por quilo de peso vivo por dia (STRINGER et al., 2015), 50 mg de EGCG por quilo de peso vivo por dia (STRINGER et al., 2017) e aproximadamente 3 mg de EGCG por dia (YIN et al., 2017), e do controle: camundongos machos com síndrome de Down Ts65Dn não tratados com EGCG.

A meta-análise do efeito geral da administração oral de EGCG em camundongos Ts65Dn no parâmetro trave de equilíbrio (BB) dos dados dos subgrupos de 6, 9 e 12 mm, não revelou diferença significativa entre o grupo com administração de EGCG e controle ($p=0,78$). Os subgrupos de 6 mm ($p=0,96$), 9 mm ($p=0,33$) e 12 mm ($p=1,00$) os resultados também não revelaram diferença em relação ao grupo com administração de EGCG e controle (Figura 4).

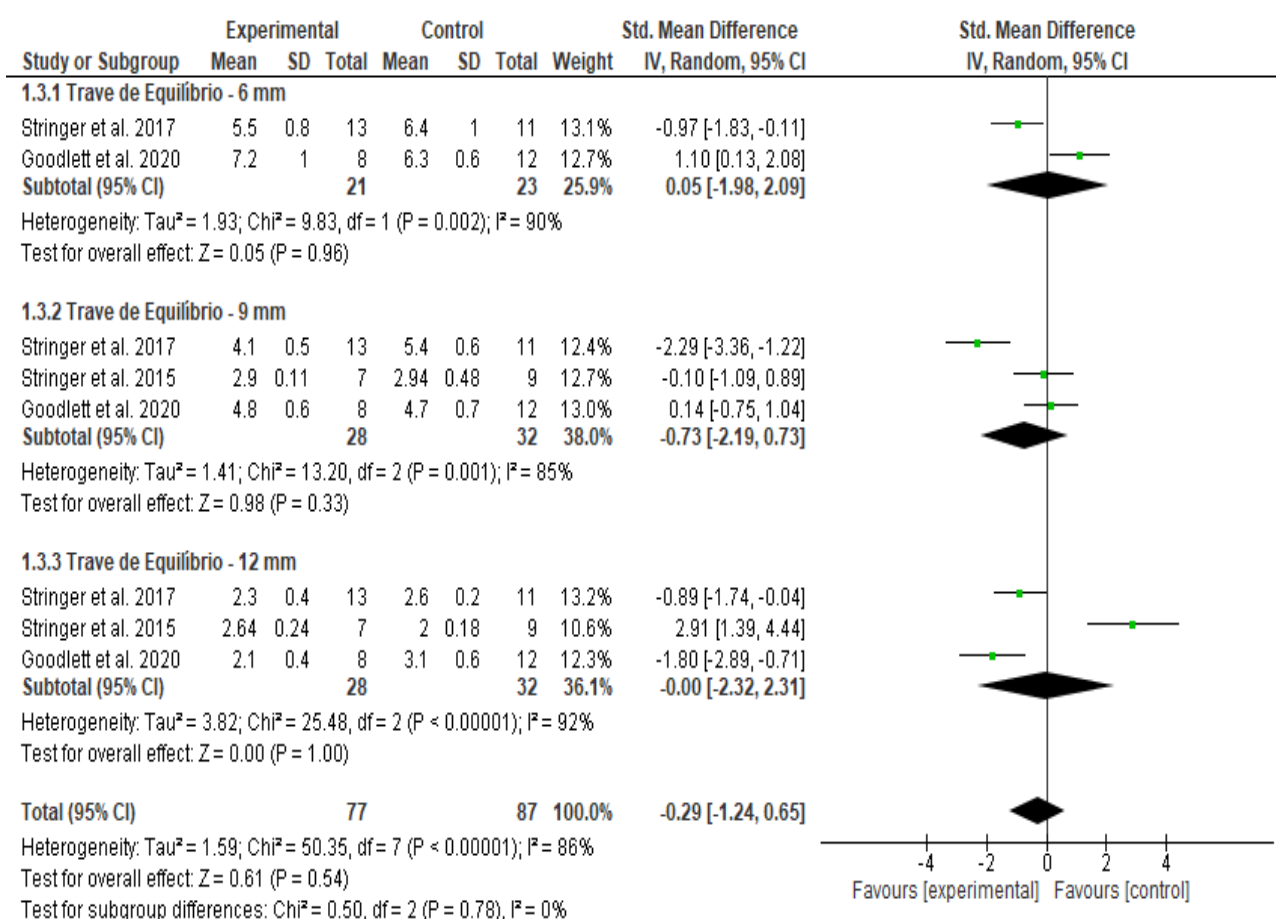


Figura 4. Forest Plot dos estudos incluídos comparando os resultados da trave de equilíbrio (BB) (média $\pm$ SD) dos grupos experimentais: camundongos machos Ts65Dn tratados com EGCG na concentração de 200 mg por quilo de peso vivo por dia (GOODLETT et al., 2020), 15,4 mg de EGCG por quilo de peso vivo por dia (STRINGER et al., 2015), 50 mg de EGCG de peso vivo por dia (STRINGER et al., 2017), e do controle: camundongos machos com síndrome de Down Ts65Dn não tratados com EGCG.

A meta-análise dos resultados relativos à tomada de risco no campo concêntrico quadrado multivariado (MCSF) em camundongos machos Ts65Dn, modelo experimental SD, demonstrou que o tratamento oral com EGCG não diferiu do grupo controle ($p=0,71$) (Figura 5).

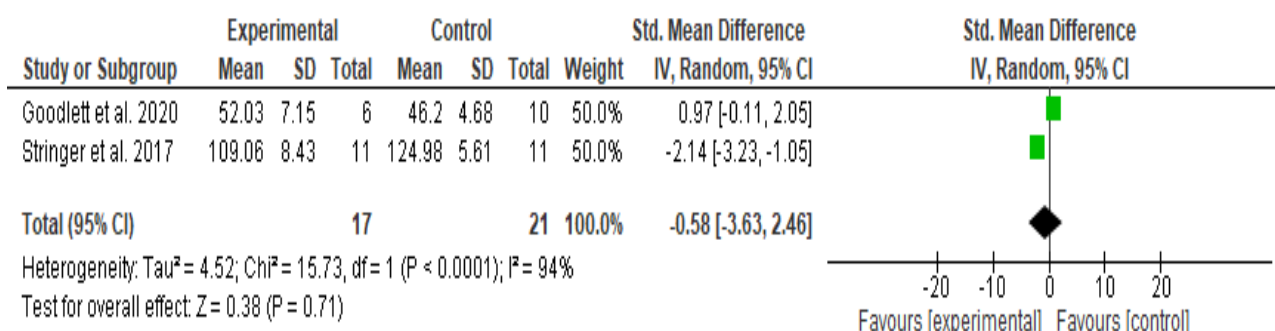


Figure 5. Forest Plot dos estudos incluídos comparando os resultados da tomada de risco no campo concêntrico quadrado multivariado (MCSF) (média $\pm$ SD) dos grupos experimentais: camundongos machos Ts65Dn tratados com EGCG na concentração de 200 mg por quilo de peso vivo ao dia (GOODLETT et al., 2020), EGCG na concentração de 50 mg por quilo de peso vivo ao dia (STRINGER et al., 2017), e do controle: camundongos machos com síndrome de Down Ts65Dn não tratados com EGCG.

A meta-análise dos resultados relativos a avaliação de risco no campo concêntrico quadrado multivariado (MCSF) em camundongos machos Ts65Dn, modelo experimental SD, demonstrou que o tratamento oral com EGCG melhorou significativamente ($p=0,00001$) esse parâmetro, quando comparado ao grupo controle (Figura 6).

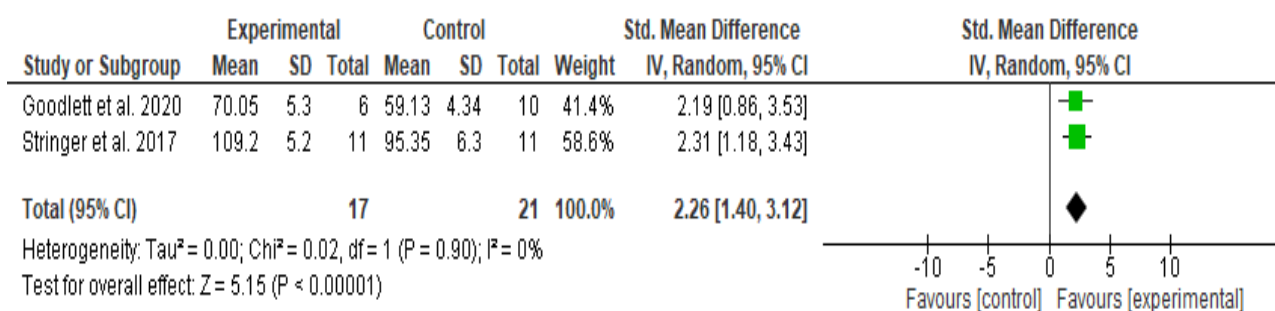


Figura 6. Forest Plot dos dados extraídos dos estudos incluídos comparando os resultados da avaliação de risco no campo concêntrico multivariado (MCSF) (média $\pm$ SD) dos grupos experimentais: camundongos machos Ts65Dn tratados com EGCG na concentração de 200 mg por quilo de peso vivo por dia (GOODLETT et al., 2020), 50 mg de EGCG por quilo de peso vivo por dia (STRINGER et al., 2017), e do controle: camundongos machos com síndrome de Down Ts65Dn não tratados com EGCG.

A meta-análise dos resultados relativos à concentração de proteína DYRK1A em áreas encefálicas: córtex cerebral, cerebelo e hipocampo em camundongos machos Ts65Dn, modelo experimental SD, demonstrou que o tratamento oral com EGCG não diferiu do grupo controle, não demonstrando melhora significativa ($p=0,58$, $p=0,14$ e $p=0,21$, respectivamente das áreas do córtex cerebral, cerebelo e hipocampo) (Figura 7, 8 e 9, respectivamente).

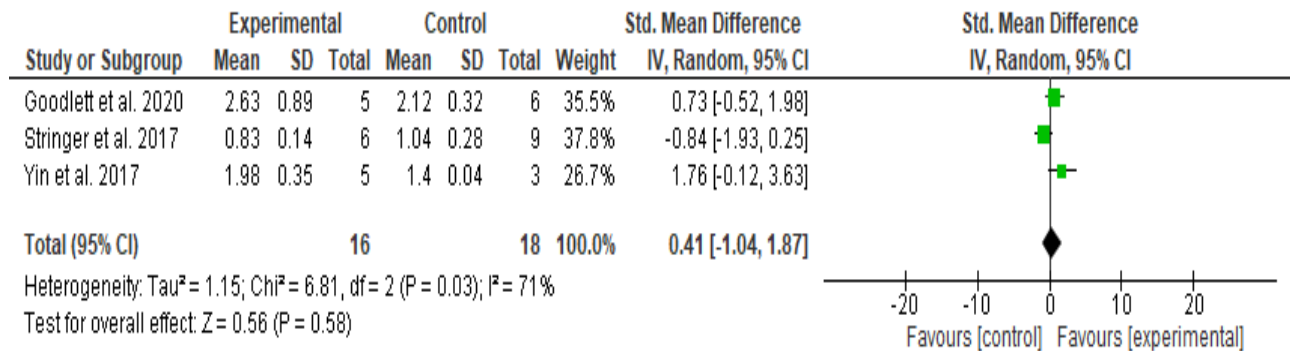


Figura 7. Forest Plot dos estudos incluídos comparando os resultados da quantificação da proteína DYRK1A, dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A, no córtex cerebral (média $\pm$ SD) dos grupos experimentais: camundongos machos Ts65Dn tratados com EGCG na concentração de 200 mg por quilo de peso vivo ao dia (GOODLETT et al., 2020), 50 mg de EGCG por quilo de peso vivo ao dia (STRINGER et al., 2017), e aproximadamente 3mg ao dia de EGCG (YIN et al., 2017) e do controle: camundongos machos com síndrome de Down Ts65Dn não tratados com EGCG.

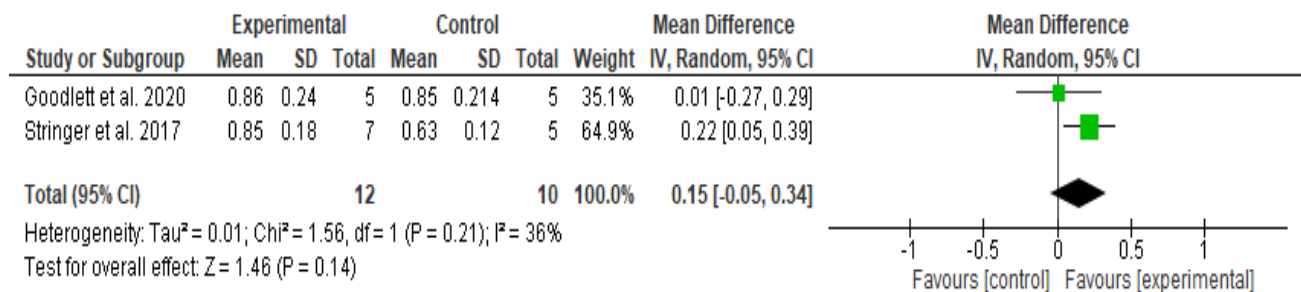


Figura 8. Forest Plot dos estudos incluídos comparando os resultados da quantificação da proteína DYRK1A, dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A, no cerebelo (média $\pm$ SD) dos grupos experimentais: camundongos machos Ts65Dn tratados com EGCG na concentração de 200 mg por quilo de peso vivo ao dia (GOODLETT et al., 2020), 50 mg de EGCG por quilo de peso vivo ao dia (STRINGER et al., 2017) e do controle: camundongos machos com síndrome de Down Ts65Dn não tratados com EGCG.

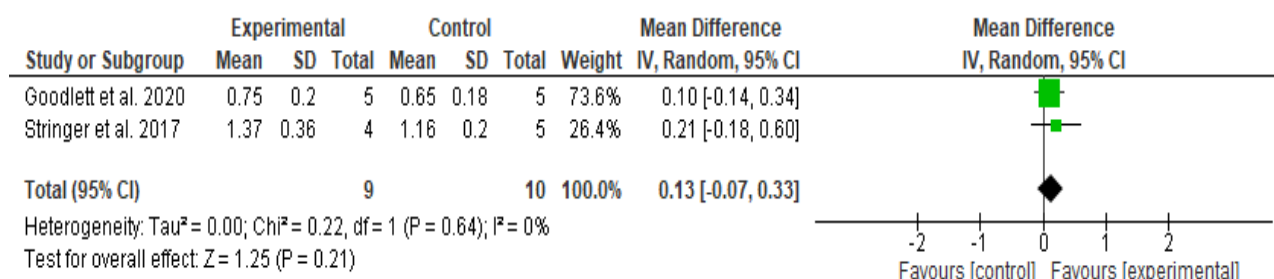


Figura 9. Forest Plot dos estudos incluídos comparando os resultados da quantificação da proteína DYRK1A, dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A, no hipocampo (média $\pm$ SD) dos grupos experimentais: camundongos machos Ts65Dn tratados com EGCG na concentração de 200 mg por quilo de peso vivo ao dia (GOODLETT et al., 2020), 50 mg de EGCG por quilo de peso vivo ao dia (STRINGER et al., 2017) e do controle: camundongos machos com síndrome de Down Ts65Dn não tratados com EGCG.

As meta-análises dos subgrupos da atividade da enzima dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) foi significativamente menor nos camundongos Ts65Dn que foram tratados com EGCG na área do córtex cerebral ($p=0,01$) e maior na área do cerebelo ($p<0,006$) e os resultados não revelaram diferença significativa ($p=0,24$) na região do hipocampo, quando comparado com o grupo controle. O teste do efeito geral revelou não existir diferença significativa ($p=0,80$) da atividade da quinase DYRK1A nas áreas combinadas: córtex cerebral, cerebelo e hipocampo entre os camundongos Ts65Dn com tratamento de EGCG e controle (Figura 10).

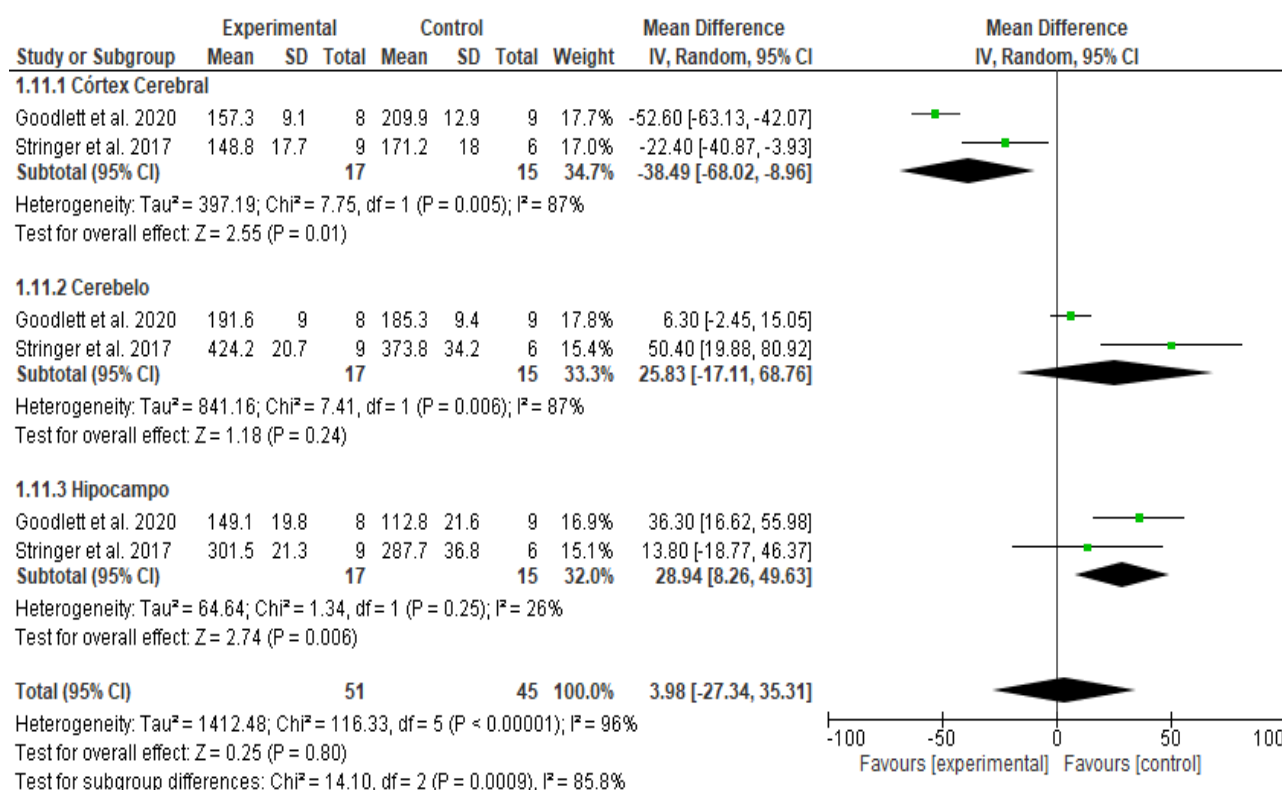


Figura 10. Forest Plot dos estudos incluídos comparando os resultados da atividade da enzima DYRK1A em camundongos machos Ts65Dn tratados com EGCG na concentração de 200 mg por quilo de peso vivo ao dia (GOODLETT et al., 2020) e 50 mg de EGCG por quilo de peso vivo ao dia (STRINGER et al., 2017) e do controle: camundongos machos com síndrome de Down Ts65Dn não tratados com EGCG.

3.3 Eficácia da administração de EGCG nos parâmetros secundários

Outros parâmetros foram considerados secundários e estão descritos na Tabela 2. A atividade locomotora foi testada com uma dosagem aproximada de 15,4 mg por quilo de peso vivo ao de EGCG e não foi observado efeito significativo do tratamento com EGCG comparado ao grupo controle ($p>0,05$)(STRINGER et al., 2015).

Na tarefa do labirinto em T, DNMP (delayed non-matching to place), os camundongos tratados com EGCG não demonstraram efeito significativo ou interativo aquisição de DNMP e as latências para escolha nos testes forçados ou nos testes de escolha não diferiram significativamente entre os grupos experimental e controle ($p>0,05$) (STRINGER et al., 2015).

Para avaliar a ansiedade, utilizaram o teste de labirinto em cruz, com dosagem de 3 mg por dia de EGCG e observaram que os camundongos Ts65Dn passaram mais tempo nos braços abertos e entraram nos braços abertos mais vezes do que os camundongos controle, sugerindo menos ansiedade em camundongos Ts65Dn. No teste de campo aberto, os camundongos Ts65Dn passaram um tempo semelhante na zona central e mostraram entradas semelhantes no centro como os controles. No entanto, a distância total percorrida pelos camundongos Ts65Dn na área foi maior do que os camundongos controle (YIN et al., 2017).

A análise do comportamento, realizada com a execução da atividade campo quadrado concêntrico multivariado (MCSF), em suas categorias entradas totais, comportamento exploratório e busca de abrigo não foi possível meta-analisar, pois os estudos não apresentaram os resultados. Isoladamente os estudos não revelaram diferença significativa (GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2017).

3.4 Qualidade dos Estudos e Risco de Viés

O risco de viés para todos os sete estudos é mostrado na Tabela 3. Todos os estudos receberam uma pontuação de qualidade igual ou superior a 4 (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LA TORRE et al., 2014; DE TOMA et al., 2019; GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2015, 2017; YIN et al., 2017). O escore de qualidade mais baixo foi 4 (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020; YIN et al., 2017) e o escore de qualidade mais alto foi 6 (DE LA TORRE et al., 2016; DE TOMA et al., 2019; GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2015, 2017). Nenhum dos estudos descreveu o cálculo do tamanho da amostra e apenas dois estudos não utilizaram o cegamento na avaliação dos resultados (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020; YIN et al., 2017). Cinco estudos mencionaram a alocação aleatória dos camundongos Ts65Dn nos grupos, assim como declararam o método preciso de randomização (DE LA TORRE et al., 2014; DE TOMA et al., 2019; GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2015, 2017). Todos os estudos mencionaram as condições em que os camundongos foram criados e explicaram sua conformidade com os regulamentos de bem-estar animal, assim como declararam possíveis conflitos de interesse (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LA TORRE et al., 2014; DE TOMA et al., 2019; GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2015, 2017; YIN et al., 2017).

Tabela 3. Avaliação da qualidade dos estudos incluídos na meta-análise.

Study	Cálculo do tamanho amostral	Alocação aleatória para tratamento	Condições de criação	Cegamento da avaliação de resultados	Conformidade com os regulamentos do bem-estar animal	Conflitos de interesses divulgados	Publicação revisada por pares	Escore de Qualidade
Da Torre et al. (2012)	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	6
Stringer et al. (2015) ³	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	6
Stringer et al. (2017)	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	6
Yin et al. (2017)	N	N	Y	N	Y	Y	Y	4
De Toma et al. (2019)	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	6
Alemaný-González et al. (2020)	N	N	Y	N	Y	Y	Y	4
Goodlett et al. (2020)	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	6

¹N = Não; ²Y = Sim.

4. Discussão

Apesar de haver uma melhora significativa no conhecimento de diferentes desordens genéticas, a síndrome de Down é a mais comum levando o indivíduo à deficiência intelectual que ainda precisa ser estudada (KAZEMI; SALEHI; KHEIROLLAHI, 2016; SHETTY et al., 2023). Uma das questões vitais de saúde pública em todo o mundo, a síndrome de Down impõe um fardo pesado à família e à sociedade (GROSSE, 2010). Estas condições associadas podem necessitar de tratamento farmacoterapêutico com vários medicamentos (HEFTI; BLANCO, 2017).

Devido às várias alterações cognitivas, motoras e morfológicas provocadas pela síndrome de Down, vários medicamentos e compostos químicos fitoterápicos estão sendo avaliados e seus resultados analisados visando alcançar a atenuação ou remissão clínica e melhora da qualidade de vida dos indivíduos portadores de síndrome de Down. Em crianças com síndrome de Down, foi demonstrado resultados preliminares quanto ao uso da EGCG no desempenho cognitivo e na funcionalidade adaptativa (CIEUTA-WALTI et al., 2022). Em jovens, o EGCG combinado ao treinamento cognitivo por 12 meses resultaram na melhora da memória de reconhecimento visual, controle inibitório e comportamento adaptativo (DE LA TORRE et al., 2016).

O camundongo Ts65Dn é o melhor caracterizado para SD, é mais amplamente utilizado apresentando muitas das características dessa síndrome, incluindo atrasos no desenvolvimento e déficits de aprendizado e memória (SHAW et al., 2020). Esse modelo animal possui trissomia para 122 genes ortólogos a HSA21 humano e 60 genes não ortólogos a HSA21 humano, dentre os genes ortólogos se encontra um importante gene associado ao desenvolvimento intelectual que se encontra em 3 cópias na SD, o gene DRYK1A (SOUCHET et al., 2014).

Esta revisão sistemática com meta-análise teve como objetivo aumentar o nível de evidência a respeito da segurança e benefícios da terapia com EGCG, por meio de indicadores convencionalmente utilizados para avaliar memória, coordenação/atividade motora, equilíbrio e atividade exploratória em camundongos Ts65Dn machos, como modelo experimental. Nenhum dos estudos relatou qualquer morte, obstáculos ou desconforto dos animais quanto ao tratamento, assim como evidências de efeitos colaterais ou indesejáveis atribuídos a intervenção por via oral, tempo de administração e ou nas concentrações/doses administradas, indicando sua segurança (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LA TORRE et al., 2014; DE TOMA et al., 2019; GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2015, 2017; YIN et al., 2017).

Como resultado de questões éticas e morais que impedem os pacientes humanos de serem submetidos as pesquisas, o desenvolvimento e a caracterização de modelos animais são necessários para uma melhor compreensão da síndrome de Down e que representam as alterações cognitivas, motoras e morfológicas proporcionadas pela síndrome são de grande importância para a pesquisa e são benéficos para o tratamento direcionado de pacientes sindrômicos individuais. Nessa revisão sistemática com meta-análise, o candidato terapêutico EGCG, principal polifenol encontrado no chá verde, demonstrou melhorar aspectos comportamentais, coordenação motora e resgatou capacidade de memória.

4.1 Parâmetros primários

A tarefa de reconhecimento de objetos novos (NOR) é um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores. Este teste se baseia na tendência natural do animal em explorar com mais intensidade o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido. O teste é avaliado por diferenças nos tempos de exploração de objetos novos e familiares (BEVINS; BESHEER, 2006) e é sensível a lesões diretas ou químicas no hipocampo (HAMMOND, 2004). A função de memória é responsável pelo hipocampo e áreas adjacentes, sendo responsável pelo reconhecimento de objetos em longo prazo (REGER; HOVDA; GIZA, 2009). Nesse estudo, os resultados revelaram que a administração de EGCG, presente no chá verde, acarretou a melhora do parâmetro reconhecimento de objetos novos (NOR) nos camundongos Ts65Dn, administrado por período de 30 a 42 dias e nas doses que variam de 2 a 15,4 mg de peso vivo por dia (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LA TORRE et al., 2014; DE TOMA et al., 2019; STRINGER et al., 2015). Isoladamente, após a administração de EGCG, as visitas a novos objetos foram tão longas quanto em camundongos não trissômicos, assim, demonstrando a capacidade de discriminar entre itens novos e familiares. Esse resultado pode indicar que o EGCG melhora o processamento da memória e manter o efeito benéfico também na atenção (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020). Outro estudo também evidenciou que o tratamento com um mês com extrato de chá verde resgatou o comprometimento da memória no teste NOR em camundongos Ts65Dn (DE TOMA et al., 2019; MARTINEZ DE LAGRAN et al., 2012). Apesar de revelar efeito significativo, a tarefa NOR foi um indicador menos confiável de déficits cognitivos, pois não foram encontrados efeitos significativos no tratamento contínuo de 49 dias, porém os resultados evidenciaram diferença no tratamento de 21 dias. As inconsistências na obtenção dos efeitos do genótipo na tarefa do objeto novo, segundo os autores, podem estar relacionadas a diferenças nos procedimentos usados (condições de iluminação, tipos de objetos), à idade no teste (jovem adulto) ou ao uso de alojamento único dos camundongos (começando logo após o desmame) para fornecer tratamento oral com EGCG (STRINGER et al., 2015). Outro estudo também evidenciou melhora no teste de NOR em camundongos Ts65Dn com um mês de administração oral de EGCG, resgatando o déficit de aprendizagem dependente do hipocampo. Além de um efeito geral no aprendizado dependente do hipocampo, estratégias de aprendizado inadequadas (tigmotaxia) foram reduzidas em camundongos Ts65Dn tratados com EGCG (DE LA TORRE et al., 2014). Em humanos, a tarefa de reconhecimento visual, processamento visuoperceptual, é o componente mais fraco da memória visual em indivíduos com SD e está relacionada com o funcionamento do hipocampo, em particular do córtex perirrinal, que está criticamente envolvido na memória de reconhecimento de objetos (BUFFALO; BELLGOWAN; MARTIN, 2006; MEUNIER et al., 1993; VICARI; BELLUCCI; CARLESIMO, 2007; WINTERS et al., 2004) e tem tamanho reduzido na SD (PINTER et al., 2001).

MWM é uma ferramenta usada em pesquisas comportamentais e cognitivas para estudar a capacidade de aprendizagem espacial do animal e a memória e permite estudar a função de várias estruturas cerebrais envolvidas na aprendizagem e na memória espacial (MORRIS, 1981). Ele também é usado para testar a eficácia de tratamentos ou drogas que possam afetar a memória espacial em modelos animais

(GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2015, 2017; YIN et al., 2017). A meta-análise do MWM, tempo gasto no alvo no MWM com a administração de EGCG não demonstrou melhora. Camundongos trissômicos foram deficientes no teste de sondagem do MWM (STRINGER et al., 2015, 2017) e tiveram redução no tempo na zona do quadrante alvo durante o teste de MWM em comparação com camundongos euplóides. Esses déficits em camundongos trissômicos foram associados ao aumento significativo do tempo próximo à parede (tigmotaxia) e ao aumento do tempo gasto flutuando. O tratamento com EGCG não melhorou esses déficits em camundongos trissômicos. De fato, o tratamento com gavagem EGCG aumentou significativamente o tempo de flutuação e simultaneamente reduziu a velocidade de natação durante a aquisição em camundongos trissômicos e euplóides. No ensaio de MWM, camundongos trissômicos apresentaram diminuição da velocidade de natação juntamente com aumento do tempo de flutuação e aumento da tigmotaxia, e o tratamento com EGCG interferiu na expressão de vieses de lugar, reduzindo o tempo na zona alvo e aumentando a tigmotaxia (GOODLETT et al., 2020).

A tarefa de aprendizado espacial do MWM é dependente do hipocampo e os camundongos Ts65Dn demonstram maior comportamento tigmotático durante o treinamento de aquisição, sugerindo que fatores como ansiedade ou reatividade ao estresse podem influenciar o desempenho (SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994). Esse teste dependente do hipocampo e curiosamente, não houve diferença significativa entre camundongos trissômicos e de controle no tempo gasto nos discos não-alvo (ou no número de cruzamentos não-alvo), indicando que o déficit no viés de pesquisa em direção ao local de destino provavelmente é uma memória prejudicada para o local, em vez de déficits generalizados no desempenho no teste de sondagem (FERNANDEZ et al., 2007). Em ratos normais foi demonstrado que o aprender rapidamente a localizar um objeto que nunca poderão ver, ouvir ou cheirar pode ocorrer, desde que permaneça em uma localização espacial fixa em relação aos sinais distais da sala (MORRIS, 1981). Portanto, o comprometimento do hipocampo decorrente da SD em humanos e modelo trissômico e consequente déficit da formação e a recordação da memória episódica reduz as interações entre o hipocampo dorsal e o córtex entorrinal (CE) vizinho (BUZSÁKI; MOSER, 2013; CANTO; WOUTERLOOD; WITTER, 2008), que processa informações multissensoriais. O modelo canônico deste circuito córtico-hipocampal postula que o hipocampo recebe informações multissensoriais das camadas superficiais do córtex entorrinal diretamente para a área CA1 (da Camada III, LIII da CE) e para o giro denteado (DG da Camada II, LII da CE). DG roteia essas entradas sensoriais via CA3 através de sinapses colaterais de Schaffer do caminho trissináptico para CA1 (BASU; SIEGELBAUM, 2015; VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009). CA1 e subiculum enviam de volta a saída de memória processada para a camada profunda V do córtex entorrinal, bem como se comunicam com várias outras estruturas cerebrais (BASU; SIEGELBAUM, 2015; RAJASETHUPATHY et al., 2015; SPELLMAN et al., 2015).

Isoladamente, somente um estudo demonstrou melhora nos resultados do teste de MWM – tempo gasto no alvo com a administração de EGCG. A EGCG acarreta a DYRK1A diferenciada em cérebros de ratos, leva ao aumento da proporção de 4R-tau e 3R-tau. O splicing alternativo do exon 10 de tau é desregulado no cérebro de camundongos Ts65Dn neonatal e nesses animais o 3R-tau aumenta e 4R-tau diminui e os animais apresentam menor ansiedade, má locomoatividade e coordenação motora e déficits de

aprendizado e memória. A administração do extrato de chá verde, fonte de EGCG, demonstrou não apenas melhorar a expressão aumentada de 3R-tau, mas também atenuou a diminuição da ansiedade e a memória prejudicada nos cérebros de camundongos Ts65Dn, indicando que o chá verde pode ser benéfico para as tauopatias como a síndrome de Down e resultantes de alterações 3R-tau (YIN et al., 2017).

O teste da trave de equilíbrio é uma técnica comumente utilizada para avaliar a coordenação motora e o equilíbrio, a trave de equilíbrio é uma estrutura estreita e longa onde os camundongos são colocados para caminhar. Essa técnica é particularmente relevante quando se estuda a SD, pois os camundongos Ts65Dn apresentam uma trissomia parcial do cromossomo 16, o que resulta em algumas alterações neurológicas e comportamentais semelhantes às observadas em seres humanos com a síndrome (GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2015, 2017). Nesse estudo, as meta-análises dos subgrupos, 6, 9 e 12 mm, e efeito total da administração de chá verde, como fonte de EGCG, não revelou diferença entre os animais Ts65Dn com administração de chá verde, como fonte de EGCG, e os grupos de animais Ts65Dn controle. Entretanto, os resultados revelaram uma tendência não significativa de menos deslizamentos no grupo controle do que no grupo Ts65Dn com administração de chá verde quando a barra tinha 6 mm, entretanto, os resultados dos dois estudos meta-analisados nesse subgrupo foram conflitantes (GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2017). Nos subgrupos de 9 e 12 mm, as meta-análises revelaram uma tendência dos grupos de animais Ts65Dn com administração de chá verde terem menos deslizamentos do que os dos grupos controle. O desempenho na trave de equilíbrio é uma medida útil de coordenação fina e equilíbrio e foi validada e pode detectar déficits motores devido à idade, lesões do sistema nervoso central e manipulações genéticas e farmacológicas em roedores jovens e idosos e com lesões de impacto cortical (CARTER; MISRA; MARONPOT, 2012; SOUTHWELL; KO; PATTERSON, 2009; WALLACE; KRAUTER; CAMPBELL, 1980). Além disso, a falta de diferenças confiáveis pode ser devido à variabilidade dos procedimentos, pois tanto os camundongos Ts65Dn, tratados ou não com EGCG, apresentaram muitos deslizamentos das patas e consequente grande dispersão do conjunto da média (STRINGER et al., 2017). Dentre os autores metanalizados, Stringer et al., (2017) obtiveram os melhores resultados quanto ao desempenho dos camundongos Ts65Dn tratados com EGCG na trave de equilíbrio, de 9 mm e 12 mm, este melhor desempenho pode estar relacionado a dosagem utilizada de 50 mg de quilo por peso vivo ao dia durante 42 dias, enquanto Stringer et al., (2015) utilizaram a dose de 15,4 mg por quilo de peso vivo ao dia durante 21 dias, uma dosagem baixa, e Goodlett et al., (2020) utilizaram uma dosagem mais elevada, 200 mg de quilo de peso vivo ao dia durante 26 dias, e os dados desse estudo revelaram que os animais Ts65Dn administrado EGCG tiveram menor deslizamento na trave de equilíbrio com maior espessura. Os outros testes, no caso de déficits motores, incluindo análise da pegada da marcha locomotora, escalada em malha, natação, escalada em poste e teste de escada, podem ser usados para avaliar melhor os déficits (BROOKS; DUNNETT, 2009; CARTER; MORTON; DUNNETT, 2001).

O campo concêntrico quadrado multivariado é um novo ambiente complexo e multicompartimental no qual os camundongos podem se movimentar e explorar livremente entre vários compartimentos e áreas abertas, elevadas ou protegidas e avalia a capacidade exploratória dos animais. Estão inclusos neste teste o comportamento exploratório, a busca de abrigo, o comportamento de risco, a avaliação de risco e as entradas

totais (MEYERSON et al., 2006). Foi meta-analisado o comportamento da tomada de risco e avaliação de risco do teste concêntrico quadrado multivariado (MCSF) e na meta-análise da tomada de risco o resultado foi favorável a administração de EGCG, porém essa diferença não foi significativa. Na avaliação de risco, o resultado foi significativamente favorável à administração de EGCG. O efeito interativo do EGCG no comportamento de risco indica que esse flavonoide pode ter efeitos benéficos para comportamentos problemáticos na SD que envolvem regulação comportamental (VAN GAMEREN-OOSTEROM et al., 2013). O EGCG demonstrou reduzir a avaliação de risco, mas este efeito em humanos exigiu uma dose relativamente elevada de 5 mg por quilograma de peso vivo ao dia. Isto é comparável a 2–3 xícaras de chá verde, sendo 3 xícaras a quantidade consumida diariamente pelo bebedor médio de chá (HU et al., 2018). O EGCG induz efeitos ansiolíticos e amnésicos comparáveis aos benzodiazepínicos (MCCRACKEN et al., 1990; VIGNES et al., 2006). A aversão ao risco induzida pelo EGCG é um tanto surpreendente, uma vez que o benzodiazepínico diazepam causou o efeito oposto de aumento da avaliação de riscos (MITCHELL et al., 2011). O diazepam e o EGCG modulam a atividade do receptor GABAA no local da benzodiazepina (CALCATERRA; BARROW, 2014; CAMPBELL; CHEBIB; JOHNSTON, 2004; HANRAHAN; CHEBIB; JOHNSTON, 2011), porém a farmacodinâmica do EGCG nos receptores GABA é menos definida (HANRAHAN; CHEBIB; JOHNSTON, 2011). Com base nos efeitos divergentes do EGCG e do diazepam na avaliação de riscos, é provável que: existam diferenças críticas, embora pouco claras, na farmacodinâmica entre estes medicamentos que evocam efeitos diferentes na tomada de decisões; a avaliação de riscos não é mediada unidirecionalmente pela ansiedade, uma vez que essas drogas exercem efeitos ansiolíticos, mas efeitos opostos na tomada de riscos (LILEY et al., 2022).

A proteína DYRK1A é uma enzima que desempenha um papel crucial na regulação de várias vias de sinalização dentro das células. Sua função principal está associada ao desenvolvimento e funcionamento adequado do sistema nervoso central e pertence à classe de quinases de dupla especificidade, sendo capaz de adicionar grupos fosfato tanto aos resíduos de tirosina, quanto aos resíduos de serina/treonina em proteínas específicas (KENTRUP et al., 1996). A proteína DYRK1A tem sido objeto de estudo na SD: o gene DYRK1A está localizado no cromossomo 21, que está triplicado na SD e codifica a proteína DYRK1A. Acredita-se que a superexpressão dessa proteína em indivíduos com SD contribui para certas características observadas nessa condição, como atraso cognitivo e alterações no desenvolvimento neuronal (YIN et al., 2017).

A concentração da proteína DYRK1A no córtex cerebral divergiu entre os estudos, demonstrando ter aumentado em dois estudos que utilizaram camundongos machos Ts65Dn com a administração de chá verde (GOODLETT et al., 2020; YIN et al., 2017). No outro estudo o aumento da proteína ocorreu nos grupos controle quando comparado com o grupo de animais com administração de EGCG (STRINGER et al., 2017). No cerebelo, a administração de chá verde, como fonte de EGCG, aumentou a concentração de DYRK1A (GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2017). A concentração de DYRK1A no hipocampo também aumentou não significativamente com a administração de EGCG (GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2017). A alteração na expressão de DYRK1A em camundongos geneticamente modificados está correlacionada com fenótipos deletérios, anormalidades no neurodesenvolvimento,

tamanho cerebral reduzido e déficits cognitivos (ALTAFAJ, 2001), portanto, o gene DYRK1A pode ser o principal responsável pelos fenótipos observados na SD (DUCHON; HERAULT, 2016).

O EGCG é um inibidor molecular da atividade de DYRK1A e supõe-se que trabalhe ligando-se ao domínio de ligação do ATP da proteína, inibindo assim sua atividade de quinase (BAIN et al., 2003).

Além disso, as disfunções mitocondriais prejudicam gravemente o desenvolvimento do sistema nervoso e estão potencialmente envolvidas na patogênese de vários distúrbios do neurodesenvolvimento, incluindo a SD, que é a causa genética mais comum de deficiência intelectual. A atividade mitocondrial é prejudicada em células periféricas de indivíduos com SD e em camundongos Ts65Dn, um modelo que recapitula muitas das principais estruturas cerebrais e fenótipos funcionais da síndrome, incluindo neurogênese hipocampal prejudicada, durante a proliferação de células progenitoras neural (NPCs) e a bioenergética mitocondrial. Nesse modelo animal, o programa biogênico mitocondrial foi fortemente comprometido nas células, mas não associado ao acúmulo de radicais livres. Estes dados apontam para um papel central da disfunção mitocondrial como uma característica inerente à SD e não como consequência do estresse oxidativo celular. O EGCG restaura a eficiência da fosforilação oxidativa e a biogênese mitocondrial, e melhora a proliferação de NPCs. Esses efeitos foram associados à ativação do eixo PGC-1 α /Sirt1/AMPK pelo polifenol (BASTIANETTO; KRANTIC; QUIRION, 2008; KIM; QUON; KIM, 2014; LEE et al., 2011; VALENTI et al., 2016).

A relativa falta de correspondências consistentes entre os níveis de proteína cerebral DYRK1A e as medidas de atividade da quinase em camundongos trissômicos, com e sem tratamento com EGCG, sugere que o ensaio de quinase pode não ser específico para a atividade da quinase DYRK1A, mas pode ser indicativo de uma atividade mais ampla da quinase (GU et al., 2020; STRINGER et al., 2017). Para determinar a atividade da quinase DYRK1A a partir de proteínas isoladas do córtex cerebral, cerebelo e hipocampo, foi usado o substrato DYRK1A, 5-carboxifluoresceína-Woodtide, e que é derivado dos aminoácidos 321-332 do fator de transcrição FOXO1 (VAN DER HEIDE; HOEKMAN; SMIDT, 2004) e os resultados extraídos foram meta-analisados e revelaram redução da atividade da quinase com a administração de EGCG no córtex cerebral e aumento não significativo na região do cerebelo. No hipocampo o resultado revelou aumento significativo. O efeito total da comparação da atividade quinase nas áreas encefálicas, não revelou diferença entre a administração de EGCG e o grupo controle. Esses resultados sugerem o EGCG induziu efeitos na atividade cerebral de DYRK1A (ou na atividade de outras quinases fosforiladas por CK1 e que fosforilam o substrato Woodtide) (VAN DER HEIDE; HOEKMAN; SMIDT, 2004). A biodisponibilidade do EGCG foi medida e descreveu estar reduzida no cérebro de camundongos (VAN DER HEIDE; HOEKMAN; SMIDT, 2004), o que poderia explicar as altas concentrações de DYRK1A nas áreas encefálicas, entretanto, outro estudo realizado posteriormente determinou que o EGCG atravessa bem a barreira hematoencefálica (GU et al., 2020).

Uma consideração importante é que além de ser fosforilado por DYRK1A, esse fragmento proteico pode ser também fosforilado por CK1 e por outras quinases ou através da normalização das vias MAPK/ERK e PI3K/Akt no cérebro de camundongos (SHIMIZU et al., 2011; VAN DER HEIDE; HOEKMAN; SMIDT, 2004). Nesse estudo, verificamos que a diminuição da atividade da proteína

DYRK1A nos grupos com administração do EGCG permitiu que a concentração se aproximasse dos níveis do que foi obtido dos animais normais, ou seja, euploides (selvagens). Nas regiões do cerebelo e hipocampo as concentrações também se aproximaram do obtido dos animais selvagens. Esse resultado permite demonstrar o efeito benéfico da administração do chá verde ou EGCG na normalização ou superexpressão do DYRK1A.

4.2 Parâmetros secundários

Os camundongos Ts65Dn, possuem uma cópia extra do gene DYRK1A e que promove uma superexpressão do gene, acarretando inibição das enzimas sintetizadoras de GABA (GAD67 e GAD65) e no transportador de GABA (VGAT) e alterando o equilíbrio excitatório/inibitório (ATAS-OZCAN et al., 2021; ZORRILLA DE SAN MARTIN et al., 2018), assim como está associado a apoptose elevada, neurodegeneração, e diferenciação neuronal anormal (PARK et al., 2007). Também afeta os processos excitatórios e modifica os níveis de receptores de glutamato (GLUR1 e GLUR2), transportador de glutamato (VGLUT1), componentes de N-metil-D-aspartato (NMDA) e reduz a ativação de CAMKII (THOMAZEAU et al., 2014). EGCG, é um inibidor molecular da atividade de DYRK1A (BAIN et al., 2003).

Um dos testes que avalia a aprendizagem condicional, labirinto em T (DNMP), é uma atividade dependente do hipocampo (BANNERMAN et al., 2008; SAGO et al., 2000). Camundongos Ts65Dn demonstraram déficits na aquisição da tarefa DNMP e o tratamento com EGCG numa concentração de 15,4 mg de peso vivo ao dia, durante 21 dias, não apresentou efeito principal ou interativo significativo e os camundongos continuaram cometendo mais erros e exigindo mais tentativas para atingir o critério de aprendizado (STRINGER et al., 2015). O labirinto em T é um teste prejudicado por alterações nos níveis de NMDA no hipocampo e que são afetados pela SD (THOMAZEAU et al., 2014). Os receptores NMDA (NMDARs) contendo subunidades NR2A ($\epsilon 1$) são os principais contribuintes para a indução de potencialização de longo prazo (LTP) do hipocampo em animais adultos e, portanto, têm sido amplamente implicados no aprendizado espacial (BANNERMAN et al., 2008; SAGO et al., 2000). Além disso, a plasticidade neuronal associada ao aprendizado, memória e desenvolvimento é controlada, em parte, pelos NMDARs, que são complexos formados pela subunidade NMDA R1 (NR1) e uma ou mais subunidades NMDA R2 (NR2A-NR2D) (PETRALIA; WANG; WENTHOLD, 1994).

No teste envolvendo a atividade locomotora, os camundongos Ts65Dn demonstraram hiperatividade em relação a camundongos euploides (selvagens) e o tratamento com EGCG não corrigiu significativamente esta característica, continuando os camundongos Ts65Dn mais ativos que os euploides (STRINGER et al., 2015).

A administração do EGCG, aumentou o nível de ansiedade dos camundongos Ts65Dn, aproximando dos resultados dos valores de normalidade, medido através do labirinto em cruz elevado e tarefa de campo aberto e indicando que a sua administração pode ser benéfica para o tratamento de alterações provocadas pela SD (YIN et al., 2017). Essa normalização dos resultados deva ser decorrente das funções

neuroprotetoras, através da atenuação da inflamação na lesão de isquemia/reperfusão cerebral e apoptose (WANG et al., 2020).

O campo concêntrico quadrado multivariado (MCSF) avalia a capacidade exploratória dos camundongos e estão inclusos neste teste o comportamento exploratório, busca de abrigo e entradas totais que não foram meta-analisados. A administração oral de EGCG na concentração de 50 mg por quilo de peso vivo ao dia, não demonstraram efeitos principais ou interativos nos comportamentos exploratório e de busca de abrigo (STRINGER et al., 2017). Também não diferiu entre camundongos Ts65Dn tratados com EGCG e controle na dose de 200 mg por quilo de peso vivo ao dia (GOODLETT et al., 2020). EGCG falhou em melhorar significativamente os resultados em camundongos trissômicos na maioria das medidas cognitivas e comportamentais avaliadas no MCSF e os autores sugerem que o resultado diferente obtidos pode estar relacionado ao tipo de administração da EGCG, gavagem ou diluído em água (GOODLETT et al., 2020; STRINGER et al., 2017).

O EGCG demonstrou corrigir atividades neurais específicas relacionadas ao processamento da memória, sugerindo seu potencial como um tratamento promissor para os sintomas cognitivos na (SD). Estes achados têm o potencial de esclarecer as bases neurais da deficiência intelectual e dos distúrbios do sono na SD, assim como em outros distúrbios cognitivos. Isso pode contribuir para uma melhor compreensão dessas condições patológicas e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020).

4.3 Qualidade dos Estudos e Risco de Viés

Após aplicação de critérios explícitos para a exclusão e inclusão, foram selecionados sete estudos. A avaliação dos estudos em animais foi realizada usando a metodologia para avaliar o risco de viés e outros critérios metodológicos de estudos publicados em animais (KRAUTH; WOODRUFF; BERO, 2013) e demonstrou que todos eles apresentam baixo risco de viés, o que indica que os estudos possuem a qualidade necessária para serem incluídos nessa revisão sistemática com meta-análise. O viés de publicação é um problema considerável para a validade da meta-análise, pois estudos com resultados significativos ou positivos são mais propensos a serem publicados do que estudos com resultados não significativos (YAZDI et al., 2017). Esta meta-análise revisou e incluiu estudos com resultados benéficos ou não benéficos da administração de EGCG. Revisões sistemáticas de estudos em animais são mais vulneráveis ao viés de publicação do que as de ensaios clínicos (LEE et al., 2019; TER RIET et al., 2012). Estudos não significativos ou desfavoráveis podem não ser publicados por razões comerciais (TANAKA et al., 2003). Os índices de significância encontrados nas meta-análises foram altos, demonstrando a heterogeneidade dos estudos e vários fatores, dentre eles a diferença na duração do período experimental, concentração administrada de EGCG, período de administração do EGCG e idade dos animais no início do experimento podem ter contribuído para isso.

Apesar da heterogeneidade, os resultados benéficos dos parâmetros meta-analisados demonstraram a eficácia da EGCG e melhora dos parâmetros comportamentais, coordenação motora e aprendizado e

concentração de proteína DYRK1A em camundongos machos Ts65Dn, como modelo experimental de síndrome de Down. Contudo, novos estudos primários deverão ser realizados para aumentar o nível de evidência dos benefícios da administração de EGCG. Os estudos incluídos neste trabalho não citaram terem excluído animal durante o período experimental por morte ou na avaliação do desfecho.

5. Limitações e pontos fortes

Os pontos fortes desta revisão sistemática com meta-análise relacionam-se à ampla estratégia de pesquisa bibliográfica usada para identificar as evidências disponíveis para responder à questão da pesquisa.

Esta é a primeira revisão sistemática com meta-análise que avalia sistematicamente estudos em animais Ts65Dn, machos, publicados, e os efeitos da administração de chá verde, como fonte de EGCG, como potencial tratamento de parâmetros relacionados a SD.

Além disso, o desenvolvimento e fundamentação desta revisão foram baseados na inclusão de estudos avaliados por meio de rigorosas ferramentas de qualidade metodológica. No entanto, as revisões sistemáticas estão sujeitas a certas desvantagens e limitações metodológicas que devem ser reconhecidas à luz dos achados. Nessa revisão sistemática com meta-análise alguns parâmetros não foram meta-analisados devido ao formato de apresentação dos dados ou mesmo supressão dos dados obtidos, o que impossibilitou a análise quantitativa.

Ressaltamos que nessa revisão sistemática com meta-análise os estudos utilizaram extrato de chá verde e chá verde, como fonte de EGCG, ingeridos oralmente e os animais utilizados foram camundongos machos Ts65Dn. A duração dos experimentos nos estudos incluídos nessa revisão sistemática variou de 21 a 150 dias e a concentração de EGCG variou entre 2 mg a 200 mg por quilo de peso vivo ao dia, o que aumentou a variabilidade dos resultados, podendo ter contribuído com heterogeneidade desse estudo. Estudos de efeitos de longo prazo do EGCG em modelos de camundongos SD e ajustes na sua concentração devem ser incentivados para entender sua aplicabilidade em ensaios com maior segurança.

É importante notar que os tamanhos das amostras para estes estudos, embora suficientes para produzir efeitos (ALEMANY-GONZÁLEZ et al., 2020; DE LA TORRE et al., 2014; DE TOMA et al., 2019; STRINGER et al., 2015, 2017; YIN et al., 2017), são relativamente pequenos ($n=8-18$ por grupo experimental). A replicação dessas descobertas é crítica para permitir uma interpretação mais aprofundada desses dados.

6. Implicações e pesquisas futuras

A produção e o consumo de chás devem continuar crescendo em nível global até 2027, estima-se em 7,5%, devido à evidência dos seus efeitos terapêuticos benéficos. Nesse estudo metanalisamos os efeitos do chá verde, como fonte de EGCG, em parâmetros comportamentais, coordenação motora, aprendizado e concentração de proteína DYRK1A em camundongos machos Ts65Dn, como modelo experimental pra SD e os achados sugerem que o EGCG pode ser um potencial tratamento terapêutico. Entretanto, o número limitado de estudos não permite tirar conclusões definitivas sobre o impacto desse composto na correção das

alterações cognitivas, motoras e morfológicas observadas em decorrência da SD. Portanto, mais estudos deverão ser feitos para aumentar o nível de evidência e assim poder recomendar o uso rotineiro de EGCG para fins de recuperação das alterações observadas nos portadores de SD.

7. Conclusão

A intervenção com EGCG demonstrou ser benéfica na correção das alterações em parâmetros comportamentais, coordenação motora e aprendizado e concentração de proteína DYRK1A observadas camundongos Ts65Dn, como modelo experimental de SD. Entretanto as evidências são baixas e mais experimentos primários são necessários para trazer luz sobre o assunto. Além disso, o mecanismo de ação do EGCG, concentrações utilizadas e período de suplementação precisam ser mais bem elucidados.

Contribuições dos autores

As responsabilidades dos autores eram as seguintes: conceberam o estudo; RAS, MJBN, MNR, RG e HRSC: conduziram a pesquisa bibliográfica e realizaram a extração de dados e avaliação da qualidade; RAS, MJBN e HBN: escreveram o rascunho do manuscrito; RAS, MNR, RG, HRSC e HBN: revisão crítica fornecida; HBN: é o fiador e tem a responsabilidade primária pelo conteúdo final; e todos os autores: leram e aprovaram o manuscrito final.

Conflitos de interesse

Nenhum dos autores relata quaisquer interesses financeiros ou potenciais conflitos de interesse.

Agradecimentos

A equipe de bibliotecários da Rede de Bibliotecas da Unoeste pelo apoio à formação dos pesquisadores / autores deste estudo na área de saúde e avaliação de tecnologias em saúde com base em evidências.

Referências

ALEMANY-GONZÁLEZ, M. et al. Prefrontal–hippocampal functional connectivity encodes recognition memory and is impaired in intellectual disability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 21, p. 11788–11798, 26 maio 2020.

- ALTAFAJ, X. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 18, p. 1915–1923, 1 set. 2001.
- ANDERSON, J. S. et al. Abnormal brain synchrony in Down Syndrome. **NeuroImage: Clinical**, v. 2, n. 1, p. 703–715, 2013.
- ATAS-OZCAN, H. et al. Dyrk1a from Gene Function in Development and Physiology to Dosage Correction across Life Span in Down Syndrome. **Genes**, v. 12, n. 11, p. 1833, 20 nov. 2021.
- BAIN, J. et al. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. **Biochemical Journal**, v. 371, n. 1, p. 199–204, 1 abr. 2003.
- BANNERMAN, D. M. et al. NMDA Receptor Subunit NR2A Is Required for Rapidly Acquired Spatial Working Memory But Not Incremental Spatial Reference Memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 14, p. 3623–3630, 2 abr. 2008.
- BASTIANETTO, S.; KRANTIC, S.; QUIRION, R. Polyphenols as Potential Inhibitors of Amyloid Aggregation and Toxicity: Possible Significance to Alzheimer's Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 5, p. 429–435, 1 maio 2008.
- BASU, J.; SIEGELBAUM, S. A. The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 11, p. a021733, 2 nov. 2015.
- BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory". **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306–1311, 12 ago. 2006.
- BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 519–529, 10 jul. 2009.
- BUFFALO, E. A.; BELLGOWAN, P. S. F.; MARTIN, A. Distinct roles for medial temporal lobe structures in memory for objects and their locations. **Learning & Memory**, v. 13, n. 5, p. 638–643, set. 2006.
- BUZSÁKI, G.; MOSER, E. I. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 130–138, 28 fev. 2013.
- CAI, J. et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates infrasound-induced neuronal impairment by inhibiting microglia-mediated inflammation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 7, p. 716–725, jul. 2014.
- CALCATERRA, N. E.; BARROW, J. C. Classics in Chemical Neuroscience: Diazepam (Valium). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 253–260, 16 abr. 2014.
- CAMPBELL, E. L.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. The dietary flavonoids apigenin and (–)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABAA receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 1631–1638, 15 out. 2004.
- CANTO, C. B.; WOUTERLOO, F. G.; WITTER, M. P. What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us? **Neural Plasticity**, v. 2008, p. 1–18, 2008.
- CARTER, C. A.; MISRA, M.; MARONPOT, R. R. Tracheal Morphologic and Protein Alterations Following Short-Term Cigarette Mainstream Smoke Exposure to Rats - Toxicologic Pathology. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 25, n. 3, p. 201–207, 2012.
- CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor Coordination and Balance in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 15, n. 1, maio 2001.
- CHACKO, S. M. et al. Beneficial effects of green tea: A literature review. **Chinese Medicine**, v. 5, n. 1, p. 13, 6 abr. 2010.
- CHU, C. et al. Green Tea Extracts Epigallocatechin-3-gallate for Different Treatments. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, 2017.
- CIEUTA-WALTI, C. et al. Safety and preliminary efficacy on cognitive performance and adaptive functionality of epigallocatechin gallate (EGCG) in children with Down syndrome. A randomized phase Ib clinical trial (PERSEUS study). **Genetics in Medicine**, v. 24, n. 10, p. 2004–2013, 1 out. 2022.
- COLAS, D. et al. Sleep and EEG features in genetic models of Down syndrome. **Neurobiology of Disease**,

v. 30, n. 1, p. 1–7, abr. 2008.

DE LA TORRE, R. et al. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 2, p. 278–288, fev. 2014.

DE LA TORRE, R. et al. Safety and efficacy of cognitive training plus epigallocatechin-3-gallate in young adults with Down's syndrome (TESDAD): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 8, p. 801–810, 1 jul. 2016.

DE TOMA, I. et al. DYRK1A Overexpression Alters Cognition and Neural-Related Proteomic Pathways in the Hippocampus That Are Rescued by Green Tea Extract and/or Environmental Enrichment. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, 15 nov. 2019.

DUCHON, A. et al. Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling down syndrome. **Mammalian Genome**, v. 22, n. 11–12, p. 674–684, 28 dez. 2011.

DUCHON, A.; HERAULT, Y. DYRK1A, a Dosage-Sensitive Gene Involved in Neurodevelopmental Disorders, Is a Target for Drug Development in Down Syndrome. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, n. JUN, 3 jun. 2016.

FERNANDEZ, F. et al. Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 411–413, 25 abr. 2007.

GOODLETT, C. R. et al. Evaluation of the therapeutic potential of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) via oral gavage in young adult Down syndrome mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10426, 26 jun. 2020.

GROSSE, S. D. Sociodemographic Characteristics of Families of Children with Down Syndrome and the Economic Impacts of Child Disability on Families. In: **Elsevier**. [s.l.: s.n.]. p. 257–294.

GU, Y. et al. Molecular Rescue of Dyrk1A Overexpression Alterations in Mice with Fontup® Dietary Supplement: Role of Green Tea Catechins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1404, 19 fev. 2020.

HAMBURG, S. et al. Dynamic Causal Modeling of the Relationship between Cognition and Theta-alpha Oscillations in Adults with Down Syndrome. **Cerebral Cortex**, v. 29, n. 5, p. 2279–2290, 1 maio 2019.

HAMMOND, R. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, n. 1, p. 26–34, jul. 2004.

HANRAHAN, J. R.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. Flavonoid modulation of GABA A receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 2, p. 234–245, 18 maio 2011.

HASLE, H., CLEMMENSEN, IH, MIKKELSEN, M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. **Lancet** **355**, 165–169 (2000).

HEFTI, E.; BLANCO, J. G. Pharmacotherapeutic Considerations for Individuals with Down Syndrome. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 37, n. 2, p. 214–220, 1 fev. 2017.

HU, J. et al. The safety of green tea and green tea extract consumption in adults – Results of a systematic review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 412–433, 1 jun. 2018.

JIN, P. et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a pro-osteogenic agent to enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow: an in vitro study. **Cell and Tissue Research**, v. 356, n. 2, p. 381–390, 29 maio 2014.

KAZEMI, M.; SALEHI, M.; KHEIROLLAHI, M. Down Syndrome: Current Status, Challenges and Future Perspectives. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 5, n. 3, p. 125–133, 2016.

KENTRUP, H. et al. Dyrk, a Dual Specificity Protein Kinase with Unique Structural Features Whose Activity Is Dependent on Tyrosine Residues between Subdomains VII and VIII. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 7, p. 3488–3495, 16 fev. 1996.

KIM, H.-S.; QUON, M. J.; KIM, J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biology**, v. 2, p. 187–195, 2014.

- KLEIN, J. A.; HAYDAR, T. F. Neurodevelopment in Down syndrome: Concordance in humans and models. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, 15 jul. 2022.
- KRAUTH, D.; WOODRUFF, T. J.; BERO, L. Instruments for Assessing Risk of Bias and Other Methodological Criteria of Published Animal Studies: A Systematic Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 9, p. 985–992, set. 2013.
- LEE, H. et al. Phase Locking of Single Neuron Activity to Theta Oscillations during Working Memory in Monkey Extrastriate Visual Cortex. **Neuron**, v. 45, n. 1, p. 147–156, 6 jan. 2005.
- LEE, J.-H. et al. Microarchitectural changes in the mandibles of ovariectomized rats: a systematic review and meta-analysis. **BMC Oral Health**, v. 19, n. 1, p. 128, 26 dez. 2019.
- LEE, M. Y. et al. Anti-asthmatic effects of Angelica dahurica against ovalbumin-induced airway inflammation via upregulation of heme oxygenase-1. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 829–837, 2011.
- LILEY, A. E. et al. Effects of the psychoactive compounds in green tea on risky decision-making. **Behavioural Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 32–41, 15 fev. 2022.
- MACLEOD, M. R. et al. Risk of Bias in Reports of In Vivo Research: A Focus for Improvement. **PLOS Biology**, v. 13, n. 10, p. e1002273, 13 out. 2015.
- MAI, C. T. et al. National population-based estimates for major birth defects, 2010–2014. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 18, p. 1420–1435, 3 nov. 2019.
- MARTINEZ DE LAGRAN, M. et al. Dyrk1A Influences Neuronal Morphogenesis Through Regulation of Cytoskeletal Dynamics in Mammalian Cortical Neurons. **Cerebral Cortex**, v. 22, n. 12, p. 2867–2877, 1 dez. 2012.
- MCCRACKEN, S. G. et al. Preference for diazepam in anxious adults. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 190–6, jun. 1990.
- MEUNIER, M. et al. Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 5418–5432, 1 dez. 1993.
- MEYERSON, B. J. et al. The Concentric Square Field: A multivariate test arena for analysis of explorative strategies. **Behavioural Brain Research**, v. 168, n. 1, p. 100–113, 15 mar. 2006.
- MITCHELL, M. R. et al. Effects of acute administration of nicotine, amphetamine, diazepam, morphine, and ethanol on risky decision-making in rats. **Psychopharmacology**, v. 218, n. 4, p. 703–712, 3 dez. 2011.
- MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **International Journal of Surgery**, v. 8, n. 5, p. 336–341, 2010.
- MORRIS, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, v. 12, n. 2, p. 239–260, 1 maio 1981.
- NISBET, L. C. et al. Characterization of a sleep architectural phenotype in children with Down syndrome. **Sleep and Breathing**, v. 19, n. 3, p. 1065–1071, 12 set. 2015.
- O'NEILL, P.-K.; GORDON, J. A.; SIGURDSSON, T. Theta Oscillations in the Medial Prefrontal Cortex Are Modulated by Spatial Working Memory and Synchronize with the Hippocampus through Its Ventral Subregion. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 35, p. 14211–14224, 28 ago. 2013.
- PARK, J. et al. Dyrk1A overexpression in immortalized hippocampal cells produces the neuropathological features of Down syndrome. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 270–279, out. 2007.
- PETRALIA, R.; WANG, Y.; WENTHOLD, R. The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 6102–6120, 1 out. 1994.
- PINTER, J. D. et al. Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: A high-resolution MRI study. **Neurology**, v. 56, n. 7, p. 972–974, 10 abr. 2001.
- PUJOL, J. et al. Anomalous brain functional connectivity contributing to poor adaptive behavior in Down syndrome. **Cortex**, v. 64, p. 148–156, 1 mar. 2015.

- RAJASETHUPATHY, P. et al. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 653–659, 5 out. 2015.
- REGER, M. L.; HOVDA, D. A.; GIZA, C. C. Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. **Developmental Psychobiology**, v. 51, n. 8, p. 672–678, dez. 2009.
- RODRIGUEZ, R. et al. Implantation of green tea catechin α -tricalcium phosphate combination enhances bone repair in rat skull defects. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 98B, n. 2, p. 263–271, ago. 2011.
- RONCA, R. P. et al. The influence of siblings with typical development on the burden and quality of life of parents of adolescents with Down syndrome. **Estudos de Psicologia (Campinas)**, v. 40, 2023.
- SAGO, H. et al. Genetic Dissection of Region Associated with Behavioral Abnormalities in Mouse Models for Down Syndrome. **Pediatric Research**, v. 48, n. 5, p. 606–613, nov. 2000.
- SHAW, P. R. et al. Longitudinal neuroanatomical and behavioral analyses show phenotypic drift and variability in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. **Disease Models & Mechanisms**, v. 13, n. 9, 1 jan. 2020.
- SHETTY, J. et al. Economic burden on caregivers or parents with Down syndrome children—a systematic review protocol. **Systematic Reviews**, v. 12, n. 1, p. 3, 6 jan. 2023.
- SHIMIZU, M. et al. Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 6, p. 832–843, jun. 2011.
- SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioural Brain Research**, v. 61, n. 1, p. 59–64, 31 mar. 1994.
- SINTON, J. W.; COOPER, D. S.; WILEY, S. Down syndrome and the autonomic nervous system, an educational review for the anesthesiologist. **Pediatric Anesthesia**, v. 32, n. 5, p. 609–616, 7 maio 2022.
- SOUCHET, B. et al. Excitation/inhibition balance and learning are modified by Dyrk1a gene dosage. **Neurobiology of Disease**, v. 69, p. 65–75, set. 2014.
- SOUCHET, B. et al. Prenatal treatment with EGCG enriched green tea extract rescues GAD67 related developmental and cognitive defects in Down syndrome mouse models. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3914, 8 mar. 2019.
- SOUTHWELL, A. L.; KO, J.; PATTERSON, P. H. Intrabody Gene Therapy Ameliorates Motor, Cognitive, and Neuropathological Symptoms in Multiple Mouse Models of Huntington's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 43, p. 13589–13602, 28 out. 2009.
- SPELLMAN, T. et al. Hippocampal–prefrontal input supports spatial encoding in working memory. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 309–314, 18 jun. 2015.
- STRINGER, M. et al. Low dose EGCG treatment beginning in adolescence does not improve cognitive impairment in a Down syndrome mouse model. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 138, p. 70–79, 1 nov. 2015.
- STRINGER, M. et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) consumption in the Ts65Dn model of Down syndrome fails to improve behavioral deficits and is detrimental to skeletal phenotypes. **Physiology & Behavior**, v. 177, p. 230–241, 8 ago. 2017.
- TANAKA, M. et al. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 95, n. 4, p. 495–502, abr. 2003.
- TER RIET, G. et al. Publication Bias in Laboratory Animal Research: A Survey on Magnitude, Drivers, Consequences and Potential Solutions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e43404, 5 set. 2012.
- THOMAZEAU, A. et al. Prefrontal Deficits in a Murine Model Overexpressing the Down Syndrome Candidate Gene Dyrk1a. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 4, p. 1138–1147, 22 jan. 2014.
- TORT, A. B. L. et al. Theta–gamma coupling increases during the learning of item–context associations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 49, p. 20942–20947, 8 dez. 2009.
- VALENTI, D. et al. The polyphenols resveratrol and epigallocatechin-3-gallate restore the severe

- impairment of mitochondria in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 6, p. 1093–1104, 1 jun. 2016.
- VAN DER HEIDE, L. P.; HOEKMAN, M. F. M.; SMIDT, M. P. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. **Biochemical Journal**, v. 380, n. 2, p. 297–309, 1 jun. 2004.
- VAN GAMEREN-OOSTEROM, H. B. M. et al. Problem Behavior of Individuals with Down Syndrome in a Nationwide Cohort Assessed in Late Adolescence. **The Journal of Pediatrics**, v. 163, n. 5, p. 1396–1401, nov. 2013.
- VAN STRIEN, N. M.; CAPPAERT, N. L. M.; WITTER, M. P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 272–282, abr. 2009.
- VICARI, S.; BELLUCCI, S.; CARLESIMO, G. A. Visual and spatial long-term memory: differential pattern of impairments in Williams and Down syndromes. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 47, n. 5, p. 305–311, 13 fev. 2007.
- VIGNES, M. et al. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate (EGCG). **Brain Research**, v. 1110, n. 1, p. 102–115, 19 set. 2006.
- WALLACE, J. E.; KRAUTER, E. E.; CAMPBELL, B. A. Motor and Reflexive Behavior in the Aging Rat. **Journal of Gerontology**, v. 35, n. 3, p. 364–370, 1 maio 1980.
- WANG, J. et al. Protective effect of epigallocatechin-3-gallate against neuroinflammation and anxiety-like behavior in a rat model of myocardial infarction. **Brain and Behavior**, v. 10, n. 6, 18 jun. 2020.
- WINTERS, B. D. et al. Double Dissociation between the Effects of Peri-Postrhinal Cortex and Hippocampal Lesions on Tests of Object Recognition and Spatial Memory: Heterogeneity of Function within the Temporal Lobe. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 26, p. 5901–5908, 30 jun. 2004.
- XIE, W. et al. Promotion of Neuronal Plasticity by (–)-Epigallocatechin-3-Gallate. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 5, p. 776–783, 17 maio 2008.
- YANG, C. S. et al. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 429–439, 14 jun. 2009.
- YAZDI, M. M. et al. Association of ESR α Gene Pvu II T>C, XbaI A>G and BtgI G>A Polymorphisms with Knee Osteoarthritis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on 22 Case-Control Studies. **Archives of Bone and Joint Surgery**, v. 5, n. 6, p. 351–362, 9 nov. 2017.
- YIN, X. et al. Dyrk1A overexpression leads to increase of 3R-tau expression and cognitive deficits in Ts65Dn Down syndrome mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 619, 4 abr. 2017.
- ZORRILLA DE SAN MARTIN, J. et al. GABAergic over-inhibition, a promising hypothesis for cognitive deficits in Down syndrome. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 114, p. 33–39, 1 jan. 2018.

2 ARTIGO 2

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES DA MEMANTINA ADMINISTRADA EM CAMUNDONGOS TS65DN: REVISÃO SISTEMÁTICA

Luiz Waldemar de Oliveira^a; Laura Franco Rodrigues^b; Souza, J. A. M^b, Hermann Bremer-Neto^a.

^a Departamento de Ciências Funcionais, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente, Universidade do Oeste Paulista, Rua José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

^b Bolsista PIBIC – CNPQ, UNOESTE

Resumo

Introdução: A síndrome de Down (SD) é uma aneuploidia, na qual os bebês nascem com uma cópia extra do cromossomo 21, e que acarretam alterações físicas e mentais ao longo da vida. Estudos clínicos e pré-clínicos investigam a administração do fármaco memantina, como intervenção, em SD ainda estão nos estágios iniciais. Nesse sentido, uma revisão sistemática com metanálise em animais, modelo pré-clínico, pode aumentar o nível de evidência e incentivar novos estudos clínicos controlados e randomizados em relação a essa intervenção.

Objetivo: O objetivo deste projeto foi realizar uma revisão sistemática para avaliar os efeitos da memantina em parâmetros comportamentais e moleculares semelhantes a SD em camundongos Ts65Dn, como modelo experimental.

Metodologia: As buscas foram realizadas nas bases eletrônicas Medline, Embase, Pubmed, Web of Science, ScienceDirect e Google Scholar disponíveis na Internet usando as palavras-chave memantina, Ts65Dn, síndrome de Down, camundongos e que são aceitas como Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e Medical Subject Headings (MeSH) e sem restrição de datas, idioma de publicação ou categoria, incluindo artigos completos, resumos e capítulos de livros. As etapas de revisão, filtragem e abastecimento da base de dados foram realizadas aos pares e em caso de dúvida um terceiro foi requisitado. Usamos o software RevMan 5.4 para a realização dos cálculos da meta-análise. A significância foi definida em $p < 0,05$.

Resultados: Inicialmente, 183 estudos foram encontrados e após aplicação dos critérios de exclusão e inclusão, seis estudos foram incluídos na análise qualitativa e dois na quantitativa. Dois estudos, com pequeno número de camundongos tratados com memantina, 18 animais, analisaram o comportamento exploratório em campo aberto (cm/s) e o resultado não revelou diferença significativa entre o tratamento e controle ($p=0,73$).

Conclusão: O resultado fornece evidências insuficientes para tirar conclusões sobre a eficácia ou segurança da memantina na SD em camundongos Ts65Dn, como modelo experimental. Ensaios rigorosos

com poder estatístico suficiente são urgentemente necessários e que possam aumentar o nível de evidência e trazer luz para a utilização desse fármaco nesta condição genética.

Palavras-chave: memantina, Ts65Dn, síndrome de Down, camundongos

1. Introdução

A síndrome de Down (SD) é uma desordem genética em humanos provocada por uma cópia a mais do cromossomo 21 (Hsa 21). Ela é a causa de deficiência intelectual (DI) mais comum nos indivíduos, provocando características fenotípicas específicas, incluindo atraso na aprendizagem e defeitos do sistema cardíaco (AHMED et al., 2015; VOS et al., 2020). A prevalência estimada para essa síndrome é de 14 nascimentos para cada 10.000 nascidos vivos e apresenta variações em diferentes populações. Ademais, a SD representa grande desafio para a área de saúde pública, com altos custos biopsicossociais para o indivíduo, para laços familiares e também para as instituições de saúde (LAIGNIER et al., 2021).

No Brasil, entre 2012 e 2018 houve a ocorrência de 386.571 nascidos vivos, em que desse valor 157 crianças nasceram com SD. Isso corresponde a uma taxa de natalidade de 4 casos de SD para cada 10.000 nascimentos (LAIGNIER et al., 2021; SHAHID; LAW; VERDEZOTO, 2022). Observa-se ainda crescimento da prevalência de indivíduos com SD devido ao aumento na sobrevivência. Isso é justificado por melhoras na assistência médica e na saúde de maneira geral, queda da mortalidade infantil além de melhor inserção social (LAIGNIER et al., 2021; REINES et al., 2017; ZAMAN; FORTEA, 2022).

A SD se origina, durante o processo de gametogênese, de falha da separação do cromossomo 21 humano, que originará um cromossomo a mais nas células do indivíduo. Tal distúrbio, cerca de 90% da trissomia do 21 livre, resulta em um erro após a meiose materna. Além disso, associa-se ainda o aumento da incidência da SD com o aumento da idade materna, sendo a idade superior a 35 anos considerada como um fator de risco a ela (REINES et al., 2017; ZAMAN; FORTEA, 2022).

Os indivíduos com SD apresentam características da expressão facial que são típicas associadas à presença de musculatura fraca durante o período infantil. Verifica-se a presença de atrasos cognitivos presente em todos os indivíduos com essa síndrome, como dificuldade inicial com a linguagem e fala, dificuldade de aprendizagem, falta de atenção e de regulação de impulsos. Acrescenta-se ainda que é um grupo que apresenta fator de risco aumentado para o desenvolvimento de doenças específicas como cardíacas, digestivas, autoimunes, leucemias e demências (HEAD et al., 2015; ZAMAN; FORTEA, 2022).

A presença do cromossomo 21 extra é responsável pela produção de cerca de 160 genes, que atuarão na codificação de diversas proteínas e também de microRNAs. A superprodução de tais genes é responsável pela mudança de diversas vias biológicas e ações no organismo, o que resultará na alteração

cerebral com déficits de memória e também de aprendizado (GIL-LLARIO et al., 2022; KULAN; DAG, 2019).

A SD tem sido difícil de ser modelada nos camundongos uma vez que os ortólogos de Hsa21 humano se localizam nos segmentos dos cromossomos 10, 16 e 17 nesses animais (AHMED et al., 2015; DIERSSSEN et al., 2021; GUPTA; DHANASEKARAN; GARDINER, 2016), e nenhum dos modelos de camundongos se mostrou em trissomia para todos os ortólogos de Hsa21 (GUPTA; DHANASEKARAN; GARDINER, 2016). Dentre os modelos experimentais, o camundongo Ts65Dn é o mais utilizado para testes de potenciais farmacoterapias e para investigação fenotípica, por apresentar fácil acessibilidade e fenótipos cognitivos semelhantes (DIERSSSEN et al., 2021; HERAULT et al., 2017). No entanto, esse modelo apresenta trissomia para o segmento Mmu17, o qual é responsável pela codificação de genes não relacionados ao Hsa21, com em torno de 35 genes que codificam proteínas, 15 não codificadores de proteínas, além de pseudogenes (DIERSSSEN et al., 2021; HERAULT et al., 2017).

O modelo Ts65Dn apresenta limitações genéticas, sendo que em torno de 55% dos genes ortólogos de proteínas do Hsa21 apresentam trissomia e 25% dos genes não ortólogos ao Hsa21 apresentaram trissomia. Dessa maneira, não pode-se deixar de considerar que esses genes trissômicos não ortólogos ao Hsa21 exerçam influências sobre os fenótipos nesse modelo animal e impactem o tratamento com possíveis farmacoterapias (GUPTA; DHANASEKARAN; GARDINER, 2016).

A memantina constitui-se como um medicamento potencial que demonstrou melhoras para o aprendizado e para memória em vários modelos animais. A ação desse fármaco consiste no ajuste da neurotransmissão excitatória agindo como antagonista parcial da atividade do receptor N-methyl-D-Aspartate (NMDAR). Dessa forma, a droga previne a citotoxicidade de Ca^{2+} que suprime a neurotransmissão excitatória (LOCKROW et al., 2011; MÖHLER, 2012). A memantina é capaz de reduzir a ativação patológica desse receptor sem alterar a sua atividade fisiológica (SCARPINI; SCHELTERNS; FELDMAN, 2003).

A fim de suprir os déficits de memória e aprendizado nas modificações provocadas pela trissomia, a inibição que é mediada por GABA_A, constitui-se como sistema vital. Dessa forma, o glutamato fará sua ligação ao receptor NMDA, que provoca aumento da entrada de cálcio para dentro das células. Essa ação faz com que radicais livres danifiquem as células. A ação da Memantina está na prevenção da ligação do NMDAR ao glutamato e assim evitando morte celular (SCOTT-MCKEAN; COSTA, 2011; WHITE et al., 2022). Assim, justifica-se a necessidade da realização de uma revisão sistemática em animais (pré-clínico), para trazer luz a essas questões e incentivar novos estudos controlados e randomizados em humanos em relação a essa intervenção.

Esta revisão sistemática tem como objetivo compilar estudos dos efeitos da administração da memantina em camundongos Ts65Dn, como modelo da SD, em parâmetros comportamentais e fisiológicos. Além disso, aumentar o nível de evidência e incentivar ensaios clínicos randomizados para avaliar a eficácia dessa droga na melhora das afecções desencadeadas pela SD em humanos.

2. Metodologia

A revisão sistemática foi conduzida de acordo com as recomendações do CAMARADES (Collaborative Approach to Meta Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies) e o protocolo foi registrado na plataforma OSF (Open Science Framework) (<https://osf.io>). As diretrizes do Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) foram seguidas para a apresentação dos resultados (MOHER et al., 2010).

2.1 Estratégia de Pesquisa

Os dados e artigos utilizados na revisão sistemática foram obtidos até o mês de maio de 2023. As buscas foram realizadas nas bases eletrônicas de dados científicos “PubMed”, “ScienceDirect”, “Web of Science”, “Scopus” e “Embase” disponíveis na Internet. Para as buscas, foram utilizadas as palavras-chave memantina, Ts65Dn, síndrome de down, camundongos que são aceitos como Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e Medical Subject Headings (MeSH). Estes termos foram utilizados em conjunto nos idiomas inglês e português. Para tornar as pesquisas mais abrangentes, nesta fase, todos os resultados obtidos foram analisados sem restrição de datas, idioma de publicação ou categoria, incluindo artigos completos, resumos e capítulos de livros.

2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os trabalhos que continham as palavras-chave foram analisados de maneira independente por tres pesquisadores do grupo (Oliveira, L.W.; Rodrigues, L. F.; Souza, J. A. M.), e após reunião de consenso, no caso de discordância, um terceiro autor foi consultado (Bremer Neto-, B.). Registros duplicados e trabalhos que não estejam relacionados aos objetivos propostos foram manualmente excluídos após análise dos títulos e/ou resumos utilizando o aplicativo Rayyan. Foram selecionados trabalhos completos que estudaram o seguinte P.I.C.O.: (1) População: murinos (camundongos) Ts65Dn (modelo da Síndrome de Down), machos; (2) Intervenção: administração de memantina; (3) Controle: murinos (camundongos) Ts65dn (modelo da Síndrome de Down), machos, não administrados memantina; (4) Desfechos: parâmetros comportamentais, sociabilidade, cognitivos, fisiológicos (mecânicas, físicas e bioquímicas) e parâmetros moleculares. Ensaio clínico em outras espécies, estudos-piloto, artigos de revisão e trabalhos que não abordaram o objetivo desta revisão foram excluídos.

2.3 Seleção dos artigos

A seleção do artigos foi realizada conforme as recomendações do PRISMA (Figura 1). Essa seleção foi realizada de forma independente por tres pesquisadores (Oliveira, L.W.; Rodrigues, L. F.;

Souza, J. A. M.) baseado nos critérios de inclusão e exclusão, e consultado um terceiro autor na dúvida (Bremer Neto, B.). Utilizando o aplicativo Rayyan, selecionamos os artigos, os duplicados foram eliminados. Ademais, foi realizada ainda uma busca nas sessões de referência bibliográficas dos artigos selecionados com o intuito de localizar pesquisas adicionais que contemplassem os critérios de inclusão propostos.

2.4 Extração de dados

Após aplicado os critérios de inclusão, foi elaborada uma planilha com os dados de cada artigo selecionados na etapa anterior a qual contém: autor(s)/ano de publicação, camundongos Ts65Dn machos, idade dos animais, tratamentos/ número de animais, droga, fabricante, via de administração, duração em dias e parâmetros analisados. Esses dados foram dispostos na Tabela 1.

2.5 Parâmetros de Interesse

Para a os objetivos dessa revisão sistemática foi definido para a realização de uma meta-análise o comportamento exploratório-Campo Aberto (cm/s).

Outros parâmetros foram eleitos para esta revisão sistemática, são eles: atividade locomotora total, teste de contexto, contexto de choque, teste de condicionamento de medo, testes sensório-motores (visão, sobressalto auditivo, reflexo de colocação de vibrissa, coordenação motora pelo Rotarod), capacidade de tração (força de preensão, reflexo de agarrar, equilíbrio), teste do Labirinto Aquático de Morris, níveis de variantes do precursor da proteína β -amilóide (A β PP), níveis hipocâmpais de VGLUT1, teste do Labirinto de Braços Radiais Win-Stay Water (WRAM), reconhecimento de Objetos Novos (NOR), níveis do fator neurotrófico derivado do córtex frontal (BDNF), imuno-histoquímica (receptor de NGF de alta afinidade TrkA, tirosina hidroxilase (TH), marcador panmicroglial CD45, esterilogia e análise de imagem (número total de neurônios TH-positivos no locus coeruleus, neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal), densidade da imunoreatividade (Cal 28k nas regiões Cornu ammonis 1 e 2 do hipocampo, CD45 nas regiões Cornu ammonis 1 e 2 do hipocampo), matrizes de proteínas de fase reversa do lisado cerebral (Classes funcionais de deficiência intelectual, aprendizagem/memória, plasticidade sináptica, transmissão sináptica), níveis/modificações de proteínas (incluindo componentes das vias MAP quinase, vias MTOR, subunidades de receptores NMDA, lisado cerebral em aprendizagem falhada e em atividade resgatada) (Tabela 1).

2.6 Qualidade dos Estudos e Risco de Viés

A qualidade dos estudos e o risco de viés foi analisada de maneira independente por tres autores (Oliveira, L.W.; Rodrigues, L. F.; Souza, J. A. M.). O intuito foi estabelecer consistência e evitar

discrepâncias na avaliação da qualidade metodológica no domínio da experimentação animal.

Para a qualidade dos estudos baseou-se no Collaborative Approach to Meta-analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies checklists (MACLEOD et al., 2015). O risco de viés foi analisado com base nos Instrumentos de Avaliação de Risco de Viés e Outros Critérios Metodológicos de Estudos Animais Publicados (2'). Havendo alguma divergência entre os autores um outro revisor (Bremer-Neto, H.) foi requisitado para resolver o impasse. Esses dois instrumentos são responsáveis pelo estabelecimento da qualidade desses artigos, variando de 0 a 7 pontos, sendo parte se seus critérios: (1) cálculo do tamanho da amostra; (2) alocação aleatória para tratamento; (3) condições de criação; (4) avaliação cega dos resultados; (5) cumprimento das regulamentações de bem-estar animal; (6) divulgação de conflitos de interesse; e (7) publicação revisada por pares (KRAUTH; WOODRUFF; BERO, 2013b; MACLEOD et al., 2015). Essa avaliação está disposta na Tabela 2.

2.7 Análise Estatística

O software RevMan 5 foi utilizado para a realização dos cálculos da meta-análise. Para a análise do inverso da variância as médias e desvios padrões dos resultados de cada estudo para comparar os dados encontrados. A heterogeneidade foi calculada usando o teste do Q2 e I2, a significância foi definida em $p < 0,10$ ou $I^2 > 50\%$. Foram analisados os efeitos randômicos dos tratamentos. O valor de $P < 0,05$ foi adotado como estatisticamente significativo.

3. Resultados

Ao total foram encontrados 183 artigos, incluídos artigos completos, artigos de revisão, resumos ou capítulos de livros que atendiam as palavras-chaves da busca bibliográfica. Em seguida, utilizando o aplicativo Rayyan, eliminou-se as duplicatas, seguido da avaliação dos títulos, restando 126 estudos. Estes estudos foram eliminados pois estavam duplicados e abordavam outra intervenção farmacológica ou outra doença. O próximo passo foi a aplicação de uma triagem, de maneira independente por dois autores, avaliados títulos e resumos, em que 23 estudos foram potencialmente escolhidos para avaliação posterior. Após leitura e análise completa, 6 estudos preencheram os critérios de inclusão propostos (AHMED et al., 2014, 2015; COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008; HIGUERA; GARDINER; CIO, 2015; LOCKROW et al., 2011; RUEDA et al., 2010). A seleção da literatura, seleção dos estudos e razão de exclusão são dispostos no diagrama de fluxo do PRISMA (Figura 1).

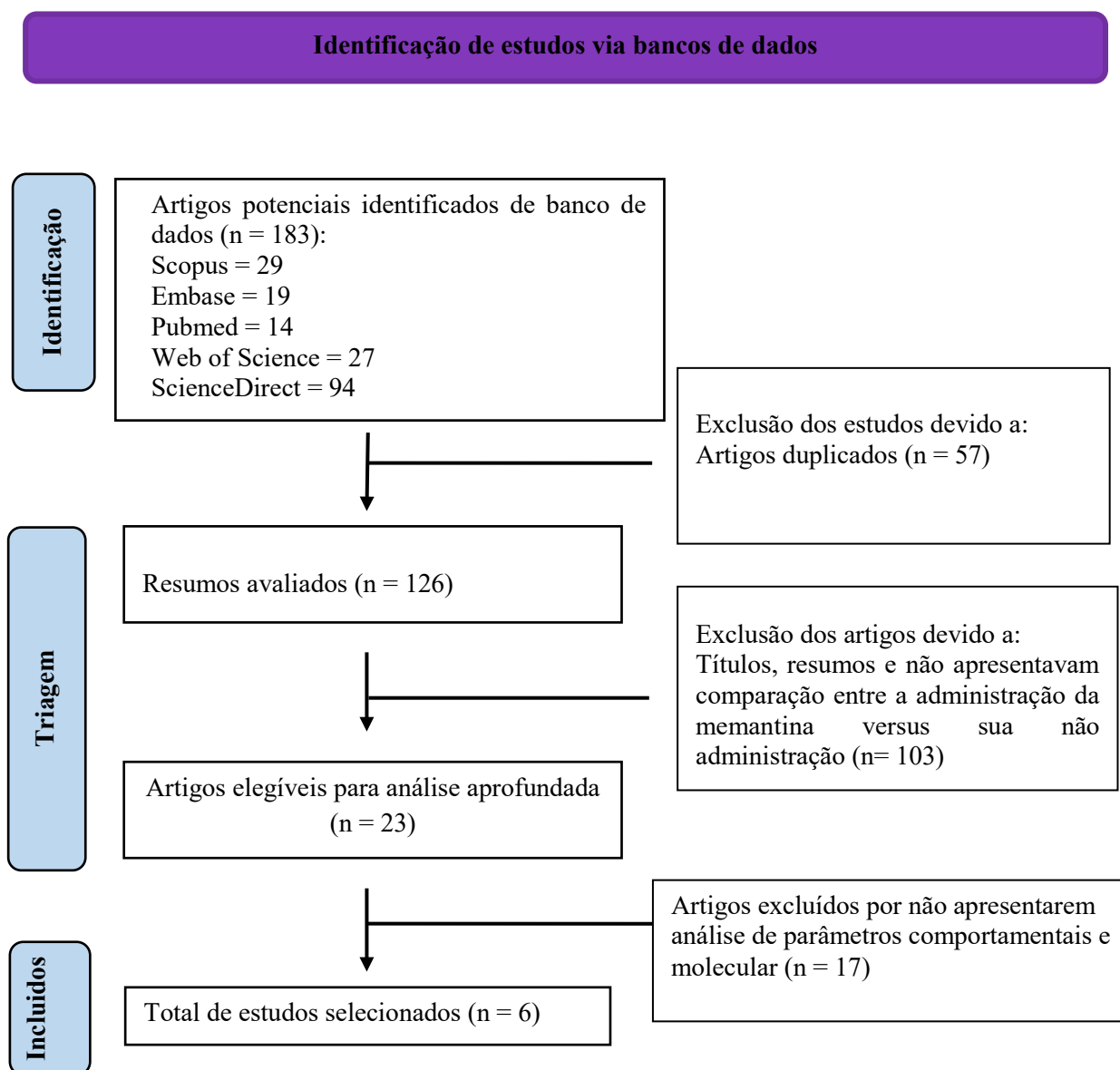


Figura. 1 Fluxograma do PRISMA com as etapas do processo de seleção da literatura e os motivos de exclusão.

Tabela 1. Sumário das características dos artigos incluídos:

Estudos	Modelo animal / Sexo	Idade dos animais	Tratamentos/ Número de animais	Droga	Fabricante	Via de administração	Duração (dias)	Parâmetros analisados
(COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008)	Camundongos TS65Dn/Mach o	4 a 7 meses	Controle = 10 Tratamentos 5mg/kg = 10 10 mg/kg = 10 15 mg/kg = 10 25 mg/kg = 10	Hidroxiclreto de memantina (1-amino-3,5-dimethyladamantan)	Sigma, St Louis, MO, USA	6,25 mL/kg intraperitoneal (i.p.)	35	Atividade locomotora total; Teste de contexto; Contexto de choque; Teste de condicionamento de medo.
(RUEDA et al., 2010)	Camundongos TS65Dn/Mach o	9 meses	Controle = 16 Tratamento = 11	Memantina	---	30 mg/kg/dia via oral	63	Comportamento exploratório – Campo Aberto (cm/s); Testes sensorio-motores [Visão, Sobressalto auditivo, Reflexo de colocação de vibrissa, Força de Preensão, Reflexo de Agarrar, Capacidade de tração e Equilíbrio, Coordenação Motora (Rotarod)]; Teste do Labirinto Aquático de Morris; Níveis de variantes do precursor da proteína β -amilóide (A β PP), níveis hipocâmpais de VGLUT1.
(LOCKROW et al., 2011)	Camundongos TS65Dn/Mach o	4 meses	Controle = 5 Tratamento = 7	Hidroxiclreto de memantina	(Torris, Bristol, UK)	20 mg/kg/dia via oral	180	Comportamento exploratório – Campo Aberto (cm/s); Teste do Labirinto de Braços Radiais Win-Stay Water (WRAM), Reconhecimento de Objetos Novos (NOR), níveis do fator neurotrófico derivado do córtex frontal (BDNF), Imuno-histoquímica [receptor de NGF de alta afinidade TrkA, tirosina hidroxilase (TH) e o marcador panmicroglial CD45 (prosencefalo basal, locus coeruleus e hipocampo)], Esteriologia e análise de imagem [Número total de neurônios TH-positivos no locus coeruleus (LC) e neurônios colinérgicos do prosencefalo basal (BFCN)], Densidade da imunoreatividade de Cal 28k e CD45 nas regiões <i>Cornu ammonis</i> 1 e 2 do hipocampo (CA1/CA2)

Tabela 1. Continuação.

Estudos	Espécie / Sexo	Idade dos animais	Tratamentos/ Número de animais	Droga	Fabricante	Via de administração	Duração (dias)	Parâmetros analisados
(AHMED et al., 2014)	Camundongos TS65Dn/Mach	3 – 4 meses	Controles Contexto-Choque = 9 Choque-Contexto = 9 Tratamentos Contexto-Choque = 10 Choque-Contexto = 9	Hidroxiclreto de memantina (1-amino-3,5-dimethyladamantan)	Sigma, St Louis, MO, USA	5 mg/kg intraperitoneal antes do experimento	35	Proteínas no hipocampo na fração nuclear, citosol e membrana; as proteínas no córtex na fração nuclear, citosol e membrana; as proteínas IEGs e modificações nas histonas no hipocampo; e o receptor NMDA e as proteínas relacionadas no hipocampo.
(AHMED et al., 2015)	Camundongos TS65Dn/Mach	3 – 4 meses	Controles Contexto-Choque = 9 Choque-Contexto = 9 Tratamentos Contexto-Choque = 10 Choque-Contexto = 9	Hidroxiclreto de memantina (1-amino-3,5-dimethyladamantan)	Sigma, St Louis, MO, USA	5 mg/kg intraperitoneal antes do experimento	35	Níveis/Modificações de proteínas, incluindo: proteínas no hipocampo e no córtex; padrão nas respostas de proteínas; proteínas no Hsa21; proteínas nas subunidades NMDAR
(HIGUERA; GARDINER ; CIOS, 2015)	Camundongos TS65Dn/Mach	3 meses	Controles Contexto-Choque = 9 Choque-Contexto = 9 Tratamentos Contexto-Choque = 10 Choque-Contexto = 9	Hidroxiclreto de memantina (1-amino-3,5-dimethyladamantan)	Sigma, St Louis, MO, USA	6,25 mL/kg intraperitoneal (i.p.)	35	As proteínas discriminantes-comparação t-CS-m vs. t-SC-m; o agrupamento de aprendizado resgatado (t-CS-m) vs aprendizado bem-sucedido no grupo controle

Os parâmetros analisados em negrito são parâmetros primários e os demais são secundários

3.1 Características dos estudos incluídos nesta revisão sistemática

Os estudos selecionados nessa revisão abordavam aspectos comportamentais e moleculares do tratamento com a droga memantina no modelo experimental, camundongo machos Ts65Dn. O parâmetro meta-analisado nos artigos foi o comportamento exploratório – campo aberto (cm/s). Outros parâmetros de relevância também foram descritos nos artigos, os quais não foram meta-analisados. O tempo de duração dos experimentos incluídos variou de 35 dias a 180 dias e foi utilizado um total de 200 camundongos machos (grupo tratamento n= 115; grupo controle n = 85). Os trabalhos foram publicados entre os anos de 2008 a 2015.

3.2 Eficácia da administração da memantina no comportamento exploratório.

O parâmetro comportamento exploratório (cm/s) foi eleito para ser meta-analisado, sendo expresso com clareza, o que permitiu a extração com segurança dos valores.

A meta-análise do parâmetro de comportamento exploratório (cm/s) não revelou diferença significativa ($p=0.73$) (Figura 2).

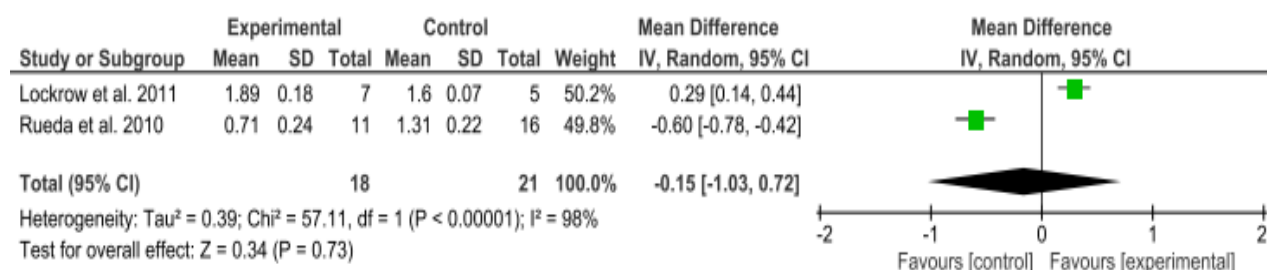


Figura. 2. Forest Plot da meta-análise do efeito da memantina no parâmetro comportamento exploratório em campo aberto e medido em cm por segundo (média $\pm$ SEM), em camundongos machos Ts65Dn.

3.3 Eficácia da administração da memantina nos parâmetros não meta-analisados

Para o parâmetro atividade locomotora os resultados, testes *post hoc*, não mostraram significância para qualquer dosagem individual da memantina: 5 mg/kg, $p = 0,6433$; para 10 mg/kg, $p = 0,0683$; para 15 mg/kg, $p = 0,1152$; e para 25 mg/kg, $p = 0,0815$. O teste de condicionamento de medo, o tempo de congelamento não diferiu significativamente entre o grupo tratado com memantina e controle ($p > 0,05$). Os camundongos Ts65Dn que receberam a injeção de memantina apresentaram tempo de congelamento significativamente maior ($p = 0,0014$) (COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008).

Não foi evidenciado efeito significativo sobre o tratamento com memantina ($p = 0,17$) no teste sensorial de visão, assim como para o teste de sobressalto auditivo no tratamento ($p = 0,62$), teste de refle-

xo de colocação de vibrissa ($p = 0,74$), reflexo de agarrar ($p = 0,062$) e capacidade de tração ($p=0,66$). Os camundongos Ts65Dn tratados com memantina demonstraram maior força de preensão ($p<0,05$) e no parâmetro equilíbrio, tarefa mais fácil (barra de madeira), os camundongos tratados com memantina apresentaram efeito benéfico ($p<0,05$). Entretanto, no parâmetro equilíbrio na tarefa mais difícil (barra de alumínio) não houve melhora ($p = 0,059$). Para o teste de Rotarod, não foi evidenciado significância sobre o tratamento a 5 rpm ($p=0,15$), 10 rpm ($p=0,62$), 20 rpm ($p=0,48$), 30 rpm ($p=0,31$), 50 rpm ($p=0,90$) e em aceleração ($p=0,75$) (RUEDA et al., 2010).

Em relação aos níveis de variantes do percussor da proteína β -amilóide (A β PP) observou-se que após o uso da droga ocorreu à diminuição desses níveis no córtex e hipocampo, porém não significativa ($p>0,05$). Os níveis VGLUT1 hipocampais não revelaram efeito significativo do tratamento ($p=0,23$). Houve aumento da imunoreatividade de VGLUT1, nos testes *post hoc*, após administração da memantina ($p < 0,05$) (RUEDA et al., 2010).

No teste do labirinto aquático de Morris os resultados não revelaram redução do intervalo da curva de aprendizado no camundongo Ts65Dn ($p>0,05$). Quando a plataforma era visível, no teste *post hoc* corrigidos por Bonferroni os resultados demonstraram melhora significativa do desempenho nos animais Ts65Dn ($p<0,05$). A administração da memantina não alterou benéficamente ($p>0,05$) a análise da velocidade de natação nos camundongos Ts65Dn (RUEDA et al., 2010).

Os resultados do teste do labirinto de braços radiais Win-Stay Water (WRAM) revelaram que os camundongos Ts65Dn que foram tratados com memantina cometeram menor quantidade de erros comparado aos Ts65Dn e que não receberam nenhuma dose entre os dias 2 e 3 do teste ($p<0,05$). Na tarefa de reconhecimento de objetos novos foi visto que os camundongos Ts65Dn tratados a longo prazo com memantina mostraram preferência pelos objetos novos durante o teste ($p<0,05$) e índice de discriminação maior ($p<0,05$). Para o tratamento agudo, na tarefa de reconhecimento de novos objetos, foi visto que a medicação melhorou ($p<0,05$) o desempenho nessa atividade em 24 horas ($p<0,05$) (LOCKROW et al., 2011).

Os níveis do fator neurotrófico derivado do hipocampo e córtex frontal (BDNF) aumentaram ($p<0,05$) após tratamento de longo prazo com memantina ($p<0,05$). O nível do receptor de alta afinidade TrkA, que avalia os efeitos de neuroproteção em relação à degeneração colinérgica (BFCN) dos ratos Ts65Dn durante o envelhecimento, foi observado que não houve nenhuma diferença estatística com o tratamento com memantina ($p>0,05$). Usando o marcador pan-microglial CD45, os resultados não revelaram diferença significativa ($p>0,05$) na imunocoloração de CD45 em camundongos Ts65Dn com administração de memantina. A degeneração do Locus Coeruleus em camundongos Ts65Dn não foi alterada após a administração de memantina ($p>0,05$). Para a análise densitométrica do CA1, foi observado diminuição da imunoreatividade de Calbindina D-28k (Cal 28k) nos camundongos Ts65Dn e que o tratamento com o antagonista parcial do receptor NMDA não foi capaz de exercer efeitos neuroprotetores na expressão do Cal 28k no hipocampo desses animais ($p>0,05$) (LOCKROW et al., 2011).

O número de proteínas alteradas em cada grupo de tratamento e região do cérebro (hipocampo e cérebro) / fração subcelular (núcleo, citoplasma e membrana) foram avaliadas em camundongos com administração de memantina e no grupo de animais com administração de memantina e submetidos ao protocolo Condicionamento Contextual de Medo (CFC), com o estímulo para o aprendizado normal e bem-sucedido (NL). No hipocampo, observa-se que na fração nuclear a memantina foi responsável pela alteração total no nível de 24 proteínas, sendo um acréscimo de 21 e diminuição de 3 proteínas. Os camundongos com estímulo NL e administração de memantina, alterou 23 proteínas, sendo acréscimo de 19 e 4 proteínas diminuíram. Na fração citosol, os resultados revelaram que a memantina foi responsável pela alteração total no nível de 22 proteínas, sendo um acréscimo de 11 e diminuição de 11 proteínas. Nos animais com estímulo NL e administração de memantina alterou 26 proteínas, sendo acréscimo de 23 e 3 proteínas diminuíram. Na membrana, os resultados revelaram que a memantina foi responsável pela alteração total no nível de 8 proteínas, sendo um acréscimo de 1 e diminuição de 7 proteínas. Nos animais com estímulo NL e administração de memantina alterou 13 proteínas, sendo acréscimo de 12 e 1 proteína diminuiu (AHMED et al., 2014).

No córtex cerebral, observa-se que na fração nuclear a memantina foi responsável pela alteração total no nível de 9 proteínas, sendo um acréscimo de 4 e diminuição de 5 proteínas. Nos animais com estímulo NL e administração de memantina alterou 31 proteínas, sendo acréscimo de 20 e 11 proteínas diminuíram. Na fração citosol, os resultados revelaram que a memantina foi responsável pela alteração total no nível de 19 proteínas, sendo um acréscimo de 13 e diminuição de 6 proteínas. Nos animais com estímulo NL e administração de memantina alterou 22 proteínas, sendo acréscimo de 6 e 16 proteínas diminuíram. Na membrana, os resultados revelaram que a memantina foi responsável pela alteração total no nível de 15 proteínas, sendo um acréscimo de 10 e diminuição de 5 proteínas. Nos animais com estímulo NL e administração de memantina alterou 18 proteínas, sendo acréscimo de 6 e 12 proteína diminuiu (AHMED et al., 2014).

Na análise molecular hipocampal, na fração do núcleo, sobre a Via MAPK, 8 componentes dessa via sofreram aumento sobre a administração sozinha da droga memantina, aos quais incluem ELK, pERK1/2, BRAF, pPKCA/B, JNK, pCAMKII, PKCA e pJNK. Quando se administra a memantina associada ao protocolo CFC verifica-se elevação nos níveis das proteínas pERK1/2, BRAF, pCAMKII e pJNK para esta via. Modificações específicas entre o tratamento e o protocolo CFC (NL) é a elevação de pPKCG (AHMED et al., 2014).

Sobre a Via MTOR os resultados revelaram aumento de 10% com a administração de memantina e 13 % na associação dessa droga mais CFC (NL). Aumento das proteínas GSK3B e de pS6 são visto na presença da memantina, e elevação nas proteínas AMPKA, P70S6 e pGSK3B-ser9 é visto na associação do fármaco ao CFC (NL). Para a proteína S6 só é vista elevação nos camundongos com a administração de memantina (AHMED et al., 2014).

Para a análise da fração citosólica, na via MTOR, a memantina diminui os níveis de S6 e pS6 respectivamente em 20 e 31%. No citosol avaliando a via MAPK, ainda é visto alterações que diferem da

fração nuclear, aumentando o nível de pERK com o medicamento, no tempo que pCAMKII tem aumento quando se associa o medicamento ao CFC (NL). Ainda nessa via, em relação ao nível BRAF verifica-se que não houve mudança com nenhuma intervenção, mas o nível de pBRAF tem aumento sobre a ação da memantina. Em relação as alterações específicas para MAPK, houve aumento de pMEK e de ELK para a memantina associada ao CFC. Para a Memantina sozinha, ainda para MAPK, o nível de MEK reduz em ~10%, enquanto que ao se associa ao CFC, há aumento de ~32% (AHMED et al., 2014).

Para avaliação das respostas das proteínas IEGs e modificações nas histonas no hipocampo foi verificado que sobre a ação da memantina e o protocolo CFC (NL), na fração citosólica, há elevação dos níveis de EGR1 e aumento exclusivo dos níveis de ARC para essa associação (AHMED et al., 2014).

No parâmetro de resposta das subunidades do receptor NMDA e proteínas relacionadas, é visto que para a terapêutica isolada com a memantina há diminuição no nível das proteínas NR1, NR2A e de ~20% no PSD95 na fração da membrana. Ao se associar a droga ao CFC, não é visto essa alteração/diminuição acentuada na fração da membrana. É percebida, ainda, elevação nos níveis de GLUR3 e GLUR4. Para a fração no citosol, viu-se grande aumento nos níveis de NR2A, com o medicamento e o CFC (NL). Quando foi administrada a droga isoladamente, no entanto, NR2A havia reduzido no citosol. Ademais, a memantina não causou alteração dos níveis na subunidades AMPAR (AHMED et al., 2014).

Na associação memantina e CFC (NL) verifica-se aumento modesto de BDNF na membrana. Tanto para memantina isolada, quando na associação ao protocolo CFC (NL) há aumento acentuado de fosfo-NUMB na fração citosólica, sendo ~40% para somente memantina e ~60% para a associação. Observa-se ainda aumento de pNUMB para a fração da membrana. Há elevação de pCAMKII em torno de ~ 50-80% para a associação na membrana. Além disso, a ação da memantina demonstrou induzir aumento de TIAM1 no citosol, mas, de maneira contrária, reduz na fração da membrana (AHMED et al., 2014). Para a análise do perfil de Proteínas do Córtex a associação da memantina ao CFC (NL) as modificações mais específicas estão na elevação no nível de GLUR3 e GLUR4 (AHMED et al., 2014).

No geral, os resultados mostram que os perfis de proteína no Ts65Dn são anormais nas condições iniciais, de linha de base, e que as respostas dinâmicas são menores do que, e muitas vezes opostas, às da aprendizagem normal neste ponto de tempo (60 minutos) após o treino. O tratamento com memantina não corrige as anormalidades iniciais e não induz as respostas dinâmicas observadas no aprendizado normal e bem-sucedido (NL), mas resulta na normalização dos perfis de desfecho, após aprendizado resgatado (AHMED et al., 2015).

Foram detectados 73, 66 e 28 ocorrências de proteínas, respectivamente, nas frações nuclear, citosólica e membrana do hipocampo e 66, 55 e 29 no córtex e essas respostas são adequadas no camundongo Ts65Dn sem tratamento com memantina e, portanto, não contribuem para o comprometimento do aprendizado. A administração da memantina induziu indiretamente as respostas necessárias: alterações estão ausentes na aprendizagem resgatada em camundongos Ts65Dn (RL), mas a memantina demonstrou induzir diretamente as alterações necessárias, ou seja, linha de base Ts65Dn

tratada com memantina (B-tm) = NL, novamente, semelhante ao acima, são os níveis das proteínas que são adequados para o aprendizado bem-sucedido e nenhuma alteração adicional no RL é necessária e ocorreram mudanças em RL que não são equivalentes às de NL e os níveis em B-tm compensem parcialmente. Nesses casos, inicial condição de trissomia (B) + inicial condição de trissomia e memantina B-tm) + e aprendizagem resgatada em camundongos Ts65Dn = NL, sendo que em cada um desses três padrões, considera-se que a falta de resposta ou resposta inadequada em aprendizagem falhada em camundongos Ts65Dn (FL) contribui para o prejuízo de aprendizagem (AHMED et al., 2015).

Para o parâmetro de padrão nas respostas de proteínas, na fração nuclear hipocampal, observa-se que o nível de CaNA se elevou em 15% para o aprendizado resgatado (t-CS-mem versus t-SC-mem). Em relação ao nível de H3AcK9 há uma diminuição em 40% para o RL. Para a fração nuclear do córtex, é verificado no nível de BRAF aumento que variou entre ~50% e ~80% para o RL. Nesses 3 casos o nível de B (condição inicial na linha de base em que t-SC-sal é comparado a c-SC-sal) apresentava-se na normalidade, e a administração da memantina não teve efeito sobre o aprendizado (AHMED et al., 2015).

Avaliando ainda o parâmetro de padrão respostas de proteínas, no córtex, em sua fração citosólica, a resposta indireta da droga no RL, resultou no aumento de 12% nos níveis de caspase 3 (CASP3). Em AKT observa-se seu aumento em RL, o qual se soma aos níveis de B, aproximando-se da resposta em NL. Em relação ao hipocampo, fração nuclear, como ação direta à memantina, o nível de c-Jun N-quinase terminal (pJNK) aumenta em 40% e sem efeito sobre RL. A protein phosphatase 2 (PP2A), na fração nuclear, e interleucina-1 beta (IL1B) na fração do citosol em que a ação farmacológica do grupo de animais do grupo linha de base Ts65Dn tratada com memantina (B-tm) produz alterações opostas a NL. No hipocampo é verificado 20 respostas como essas produzidas pela memantina e no córtex há 40 delas (AHMED et al., 2015).

Na avaliação das proteínas presentes no Hsa21 gene DYRK1A (dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1) é aumentado nos animais tricossômicos linha de base no hipocampo em sua fração do citosol e no córtex ela é elevada na fração do citosol e nuclear. A administração da memantina corrige esse nível alto no córtex, no citosol, e nas demais frações ela aumenta mais os níveis no RL. A proteína intersectina-1 (ITSN1), proteína de endocitose multidomínio presente no córtex, em sua fração nuclear aumentou no RL. Em relação ao hipocampo, os níveis de ITSN1 ainda foram altos, no entanto, sem efeito da memantina, exceto indiretamente um decréscimo em RL presente na fração de membrana (AHMED et al., 2015).

Em relação as modificações de proteínas nas subunidades do receptor NMDA (NMDAR), que é um receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico (glutamato)/aspartato e seu agonista exógeno NMDA, no hipocampo, verifica-se nas subunidades NR2A e NR2B do receptor NMDA poucas alterações diretas, na fosforilação ou na localização dessas subunidades. Na subunidade NR2A, na membrana, o RL tem uma diminuição de 20% e é igual ao falhado, não havendo efeito da memantina sobre essa resposta. No citosol, a memantina diminui 30%, que dá sequência a um aumento de 80% em RL. Os níveis da proteína pNR2A, no citosol, demonstraram elevação em ~13% para animais do grupo linha de

base Ts65Dn tratada com memantina e RL. Na subunidade NR2B na fração citosólica há aumento do nível em RL e os níveis de proteínas pNR2B tbm há aumento em RL. No que se refere a subunidade NMDAR no córtex, a administração da memantina tem efeitos diretos mais dramáticos. A farmacoterapia com a memantina sozinha induz a elevações que variam de mais de 50% a 100% em NR2A, pNR2A, NR1 e pNR, na fração de membrana. Como respostas à memantina, inclui diminuições subsequentes no RL, o que sugere que as respostas dinâmicas são imprescindíveis ao aprendizado bem sucedido (AHMED et al., 2015).

Na análise das proteínas discriminantes para a classe de camundongos trissômicos, ao se realizar a comparação entre o grupo do Ts65Dn com o estímulo para aprender (CS) e a memantina (t-CS-m), versus o Ts65Dn sem o estímulo de aprender (SC) e a memantina (t-SC-m), é identificado as proteínas que tem resposta ao aprendizado falhado quando há resgate pela droga nos camundongos com a trissomia. Os resultados revelaram que o nível de 36 proteínas com o medicamento são diferentes, ao se comparar com a atividade falhada, no entanto, 7 destas proteínas estiveram presentes na aprendizagem falhada e 17 delas também ocorreram no grupo controle na aprendizagem normal. Isso indica que a droga age promovendo mais respostas normais, sobre o estímulo de aprendizagem, mas não todas as respostas normais (HIGUERA; GARDINER; CIOS, 2015).

Ao se investigar a comparação entre t-CS-m versus o camundongo trissômico sem o estímulo de aprender e com a injeção salina (t-SC-s) foi reconhecido um total de 20 proteínas, onde se observou que apesar do aprendizado resgatado pela droga conduzir a mais respostas proteicas, somente metade delas é equivalente ao aprendizado normal em camundongos trissômicos controle (HIGUERA; GARDINER; CIOS, 2015).

Ao se examinar ação da droga, memantina, apenas nos camundongos trissômicos, sobre a comparação t-SC-m vs t-SC-s [camundongo Ts65Dn que não recebe o estímulo para aprender (SC) sobre a administração de memantina comparado a de solução salina] verifica-se algumas alterações sobre as condições iniciais para as mais favoráveis ao aprendizado. Logo, 12 proteínas alteraram a pPKCG, S6, pS6, ERBB4, SNCA, pPKCAB, pMTOR, pNR2A, pP70S6, ARC, P3525 e BAD, as quais 3 estão em comum com as encontradas no controle sobre a ação da memantina e 6 em comum na avaliação do aprendizado normal (HIGUERA; GARDINER; CIOS, 2015).

Para o parâmetro de agrupamento entre o aprendizado resgatado com a memantina (t-CS-m) e os grupos onde o aprendizado foi bem-sucedido (2 classes do controle) sugere-se que os níveis anormais das proteínas pNR1, MTOR, APP, RAPTOR, NR2B, P38, Tau, GluR3, S6 e EGR1 são críticas para o aprendizado falhado. O tratamento com a droga memantina induziu respostas nessas proteínas e foi capaz de levar ao aprendizado resgatado e também um perfil proteico que não se difere do aprendizado bem sucedido (HIGUERA; GARDINER; CIOS, 2015).

3.4 Qualidade dos Estudos e Risco de Viés

Todos os trabalhos inclusos receberam um escore de qualidade igual ou superior a 4 pontos (AHMED et al., 2014, 2015; COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008; HIGUERA; GARDINER; CIOS, 2015; LOCKROW et al., 2011; RUEDA et al., 2010). A pontuação onde a qualidade foi mais baixa foi de 4 pontos (AHMED et al., 2014, 2015; HIGUERA; GARDINER; CIOS, 2015) e a pontuação onde a qualidade foi mais alta foi de 5 pontos (COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008; LOCKROW et al., 2011; RUEDA et al., 2010). Desses estudos, nenhum descreveu cálculo do tamanho amostral e a locação aleatória para tratamento. O cegamento da avaliação dos resultados foi realizado apenas por 3 estudos (COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008; LOCKROW et al., 2011; RUEDA et al., 2010). Todos os estudos descreveram as condições de criação, as conformidades com os regulamentos de bem-estar animal e a divulgação dos conflitos de interesses. Em todos esses estudos a publicação foi revisada por pares (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da qualidade dos estudos incluídos na meta-análise.

Study	Cálculo do tamanho amostral	Alocação aleatoria para tratamento	Condições de criação	Cegamento da avaliação de resultados	Conformidade com os regulamentos do bem-estar animal	Conflitos de interesses divulgados	Publicação revisada por pares	Escore de Qualidade
Costa et al. (2008)(COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008)	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	5
Rueda et al. (2010)(RUEDA et al., 2010)	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	5
Lockrow et al. (2011)(LOCKROW et al., 2011)	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	5
Ahmed et al. (2014)(AHMED et al., 2014)	N	N	Y	N	Y	Y	Y	4
Ahmed et al. (2015)(AHMED et al., 2015)	N	N	Y	N	Y	Y	Y	4
Higuera et al. (2015)(HIGUERA; GARDINER; CIOS, 2015)	N	N	Y	N	Y	Y	Y	4

¹N = Não; ²Y = Sim.

4. Discussão

O objetivo dessa revisão sistemática foi avaliar os efeitos da droga memantina em parâmetros associados aos comportamentos e/ou moleculares no camundongo Ts65Dn, modelo pré-clínico de Síndrome de Down. Não foi relatado em nenhum dos estudos morte ou desconforto dos animais durante o período experimental, bem como efeitos adversos ou indesejáveis advindos das vias de administração, oral ou intraperitonal, da droga, assim como tempo ou concentrações, demonstrando a segurança do medicamento nas condições dos estudos incluídos nesse trabalho.

Devido às diversas manifestações associadas à SD, como a deficiência intelectual e aos grandes avanços na compreensão das relações entre o genótipo e o fenótipo, torna-se necessário a busca por potenciais terapias, as quais possam alcançar a atenuação e/ou a remissão clínica e melhora na qualidade de vida dos indivíduos com SD (ANTONARAKIS et al., 2020; DELABAR et al., 2016).

Entretanto, em modelo animal, a SD mostrou-se difícil de modelar em camundongos, apresentando genes adicionais triplicados em superexpressão (AHMED et al., 2015; DIERSEN et al., 2021; GUPTA; DHANASEKARAN; GARDINER, 2016). Os ortólogos de Hsa21 estão localizados nos segmentos dos cromossomos 16, 17 e 10 dos camundongos e nenhum dos modelos criados mostrou-se trissômico para o total de ortólogo de Hsa21 (AHMED et al., 2015; GUPTA; DHANASEKARAN; GARDINER, 2016). O modelo Ts65Dn apresentou trissomia em aproximadamente 55% dos genes ortólogos de proteínas do Hsa21 e também de em grande quantidade de proteínas não ortólogas de Hsa21 (GUPTA; DHANASEKARAN; GARDINER, 2016).

O camundongo Ts65Dn, em decorrência de sua acessibilidade e fenótipos cognitivos, tem sido o modelo mais utilizado por pelo menos 20 anos (DIERSEN et al., 2021; HERAULT et al., 2017). Embora nesses camundongos a memantina tenha demonstrado benefício na reversão de alguns parâmetros, ao se executar ensaios clínicos em humanos o tratamento com ela não surtiu efeito em melhoras cognitivas (COSTA et al., 2022; HANNEY et al., 2012).

Nesta revisão sistemática, os resultados dos parâmetros comportamentais apontaram para os parâmetros moleculares e o tratamento com memantina demonstrou ser capaz de elevar proteínas importantes para o aprendizado e a memória. Essa diferença entre os estudos pré-clínicos e os estudos clínicos na população humana, pela memantina, pode ser resultado da modulação no camundongo Ts65Dn, o qual não resgata todas as anormalidades presentes do Hsa21.

4.1 Meta-análise do comportamento exploratório

Os dados extraídos da meta-análise demonstram que o tratamento com a memantina, para o parâmetro comportamento exploratório, não foi responsável por aumentar o total da distância percorrida em cm ($p=0,73$). O comportamento exploratório, realizado em campo aberto, é um parâmetro comportamental usado na avaliação da locomoção, níveis de ansiedade e comportamentos estereotipados em roedores. Quando há mudanças na locomoção, isso é indicativo de que há alterações na função cerebral, com alteração

de processos neurológicos. Também é útil na avaliação dos níveis de estresse, em que os camundongos estressados apresentaram menor atividade no campo e elevação do comportamento estereotipado (comportamentos de repetição, sem propósito). Os camundongos, que passam a maior parte do tempo próximo às paredes (tigmotaxia) demonstram sinais que se assemelham a ansiedade, devendo eles, ao serem colocados em novo ambiente, passar mais tempo explorando, na área central (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; SMITH; MORRELL, 2007; STURMAN; GERMAIN; BOHACEK, 2018).

Nos dois artigos utilizados na meta-análise não foi descrito alterações na atividade locomotora/exploratória após a administração da memantina (LOCKROW et al., 2011; RUEDA et al., 2010). Foi observado que os camundongos Ts65Dn passaram menos tempo no centro do aparelho de campo aberto e maior tempo na periferia (tignotaxia), ao serem inseridos em um novo local, o que indica menor atividade exploratória e maiores níveis de ansiedade, sendo que o tratamento com a memantina não alterou esse parâmetro (LOCKROW et al., 2011).

Do ponto de vista do efeito de uma determinada droga diretamente sobre a atividade locomotora, o aumento da locomoção pode ser considerada como um efeito estimulante, ao passo que a diminuição pode ser considerada como efeito sedativo (PRUT; BELZUNG, 2003). Para os dois artigos, não houve aumento significativo na atividade locomotora sobre o tratamento com a memantina, não sendo verificado possíveis efeitos estimulantes ou sedativos (LOCKROW et al., 2011; RUEDA et al., 2010).

4.2 Parâmetros não meta-analisados

A atividade locomotora nos camundongos também foi avaliada em outro estudo, em que a principal medida nesse estudo foi o valor total de interrupções da fotocélula em um tempo de 5 minutos, não sendo possível de ser meta-analisada por estar expresso de outra maneira. Foi verificado não haver significância nos testes post hoc ao tratamento com a memantina para as dosagens de 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, e 25 mg/kg. Isso indica que não houve aumento com significância na atividade locomotora induzida pela droga, nem efeitos estimulantes nos camundongos Ts65Dn. Para outras dosagens em camundongos ddY machos, ao serem injetados na dosagem de 0,625, 2,5 ou 10 mg por camundongo é relatado aumento da atividade locomotora dose-dependente (ONOGI et al., 2009). No entanto, para os camundongos Ts65Dn na dosagem mencionada, o mesmo não é válido, em que não foi visto aumento da atividade locomotória com significância.

O condicionamento do medo contextual em ratos consiste em um modelo para esclarecer os mecanismos cruciais relacionados ao aprendizado e a memória, sendo um dos seus principais focos a função do hipocampo frente a um evento que cause medo (WEHNER; RADCLIFFE, 2004). Nesse teste, há dois protocolos, o protocolo de choque de contexto (context-shock protocol) e o protocolo de contexto de choque (shock-context protocol). No context-shock protocol esses camundongos são expostos a um contexto, o qual serve como estímulo de aprendizagem, e logo em seguida são expostos a um choque elétrico (geralmente choque nas patas). Após 24 horas esses camundongos são novamente repostos ao contexto, devendo eles

apresentarem congelamento, o que indica que houve aprendizado. No protocolo de shock-context protocol os camundongos recebem imediatamente um choque e depois são expostos a um contexto. Para esse protocolo não é esperado que estes animais aprendam, não adquirindo medo condicionado (COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008; SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003; WEHNER; RADCLIFFE, 2004). Para o estudo selecionado foi verificado que ao se administrar a memantina o tempo de congelamento nos camundongos Ts65Dn se tornou equivalente aos camundongos euplóides e que ao se compará-los com a injeção de solução salina esse tempo de congelamento foi significativamente maior (COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008). Esses dados indicam que a administração da droga, ao aumentar o tempo de congelamento, resgatou o aprendizado nos camundongos Ts65Dn. A avaliação do tempo de congelamento permite a identificação dos efeitos significativos do tratamento (CAVALCANTE, 2017).

O teste sensorial de visão, sobressalto auditivo, reflexo de colocação de vibrissa, reflexo de agarrar, capacidade de tração não foram benéficamente influenciado pelo tratamento com a Memantina. No teste sensorial de visão é avaliado reflexo de colocação visual em que os camundongos são abaixados pela cauda em direção à borda de uma superfície, devendo eles realizarem a extensão das patas. Para isso é atribuído uma pontuação de 0 a 4 (ESCORIHUELA et al., 1995; KLEIN et al., 1996; RUEDA et al., 2010). Na literatura é demonstrado que não há diferença entre o tempo que os camundongos Ts65Dn estendem as patas e os camundongos euplóides (ESCORIHUELA et al., 1995; KLEIN et al., 1996). Logo, em concordância com os dados dispostos nesses estudos, não havia diferença sem algum tratamento, e com a administração da memantina não houve alteração para esse resultado.

O teste de sobressalto auditivo não foi alterado pelo tratamento com a memantina. A resposta de sobressalto auditivo é um simples reflexo de todo o corpo do animal após ouvirem um som de alta intensidade e breve, usada na avaliação da capacidade auditiva/ sensibilidade auditiva (FAWCETT et al., 2020). A deficiência auditiva é uma das características fundamentais da síndrome de Down, em que os camundongos são úteis para a compreensão dos mecanismos relacionados a essas perdas auditivas (CHEN et al., 2022). A causa dessas perdas auditivas é variável como: perdas condutivas entre a orelha externa e a orelha média, por malformações craniofaciais na orelha externa, por líquido que se deposita na orelha, por deformações nos ossos da orelha média que reduzem sua mobilidade, anormalidades na cóclea e sistema vestibular entre outras (AUSTENG et al., 2013; CHEN et al., 2022; SALIBA et al., 2014). A administração da memantina não alterou a resposta a esse teste ou teve efeito sobre a capacidade auditiva.

No teste de colocação de vibrissa a reação do camundongo ao toque em suas vibrissas é avaliada de 0, em que não há resposta e 1, quando eles tocam as vibrissas após serem estimulados (KLEIN et al., 1996; RUEDA et al., 2010). Esse teste é responsável pela verificação de modificações sensorio-motor, o qual pode ter alteração de desenvolvimento (CHEHIMI et al., 2012; CIPRIANI; BRUNI, 1986). As vibrissas são fontes primárias de coleção de informações do ambiente, integrando processos sensorio-motores e direcionam comportamentos adaptativos (ARAKAWA; ERZURUMLU, 2015). Para esse parâmetro, não houve qualquer efeito do tratamento com a memantina sobre o sistema sensorio-motor.

O reflexo de agarrar/ preênsil e a capacidade de tração não sofreram alteração com a administração da memantina. O reflexo preênsil consiste na capacidade do camundongo agarrar uma barra com as patas

dianteiras e permanecer suspenso, sendo que sua avaliação refere-se a uma medida da força muscular (DEAN et al., 1981; JOHANSSON, 1996). A capacidade de tração, por sua vez, é responsável pela medida de força muscular, do tônus e do equilíbrio. É avaliada ao mesmo tempo que o reflexo preênsil, em que o animal está suspenso horizontalmente por suas patas dianteiras a uma barra e é contado o tempo até esse animal colocar as patas traseiras na barra (DEAN et al., 1981).

A administração da memantina revelou aumentar a força de preensão nos camundongos Ts65Dn. Os indivíduos com SD apresentam anormalidades neuromusculares como fraqueza muscular (hipotonia), alteração de reflexos primários, alterações no equilíbrio corporal, densidade óssea imprópria, entre outras (MALAK et al., 2013). Estudos demonstraram que a memantina faz o bloqueio da transmissão neuromuscular, interagindo no complexo receptor íon canal da placa terminal, o que pode sugerir os benefícios da droga no aumento da força de preensão, com a correção de alterações neuromusculares (MASUO; ENOMOTO; MAENO, 1986). No entanto, esse mecanismo merece melhores estudos, conforme afirma os autores (RUEDA et al., 2010). O reflexo preênsil e a capacidade de tração refletem a força muscular e não sofrem alterações significativas sobre o tratamento, ao passo que a força de preensão aumentou, outros estudos devem ser realizados para elucidar tais mecanismos (DEAN et al., 1981; JOHANSSON, 1996; MASUO; ENOMOTO; MAENO, 1986; RUEDA et al., 2010).

Resultados demonstram que as alterações mais evidentes no camundongo Ts65Dn relacionam-se ao equilíbrio e a coordenação, coerente com as observações clínicas dos indivíduos com SD. Os estudos demonstraram que ao avaliar o equilíbrio e a coordenação motora, por aparelho de Rotarod, os camundongos trissômicos tem a aquisição dessas duas habilidades de maneira atrasada e não apresentam grande sinal de melhora em testes consecutivos (COSTA; WALSH; DAVISSON, 1999). Para o parâmetro de equilíbrio o tratamento melhorou apenas a tarefa mais fácil (barra de madeira), enquanto que para a tarefa mais difícil (barra de alumínio) nesse parâmetro não houve resgate. A memantina não resgatou a coordenação motora avaliada no teste de Rotarod (RUEDA et al., 2010).

O tratamento com a memantina não diminuiu os níveis do precursor da proteína β -amilóide ($A\beta$ PP) sobre o córtex e sobre o hipocampo, não mostrando benefício sobre esse parâmetro nos estudos pré-clínicos no camundongo ts65Dn (RUEDA et al., 2010). Os indivíduos com SD, devido a cópia extra do gene precursor da proteína amilóide no cromossomo 21, desenvolvem a patologia semelhante a doença de Alzheimer (DA) de idade precoce (CHOI et al., 2009; TALLINO et al., 2022). A administração de memantina mostra-se benéfica ao reduzir os níveis de $A\beta$ (peptídeo β -amilóide) no cérebro de diversas linhagens de camundongos, sendo disponível atualmente como opção terapêutica para o tratamento da DA (ITO et al., 2017; MATSUNAGA et al., 2018). No entanto esse tratamento nos camundongos Ts65Dn não mostrou-se benéfica (RUEDA et al., 2010). Isso pode ocorrer porque, na SD a triplicação no HSA21 em humanos leva invariavelmente a deposição β -amilóide (elevação e acúmulo de $A\beta$ central), a trissomia presente no Ts65Dn não leva a patologia de acúmulo β -amilóide, mas causa desregulação do complexo em APP (proteína precursora de amilóide) (CHOI et al., 2009).

O parâmetro de níveis de VGLUT1 hipocámpais não foi benéficamente influenciado pelo tratamento com a memantina ao se realizar a ANOVA. O estudo aponta aumento nesses níveis, porém sem

significância. Ao realizar um teste de post hoc o estudo identifica aumento da imunorreatividade de VGLUT1 após administração da memantina ao nível normossômico (RUEDA et al., 2010). Na avaliação do sistema glutamatérgico os níveis de VGLUT1 são fundamentais na transmissão excitatória, a qual realiza a excitação do neurônio pós-sináptico. É expresso principalmente no córtex, cerebelo e no hipocampo, e realiza papel imprescindível na memória, plasticidade das vias sinápticas e atividade neuronal (DU et al., 2020; LIGUZ-LECZNAR; SKANGIEL-KRAMSKA, 2007). Os resultados do estudo demonstram que os camundongos Ts65Dn apresentam diminuição dos níveis de VGLUT1, o qual interfere na memória e no aprendizado, no entanto o nível de VGLUT1 não foi resgatado com o tratamento (DU et al., 2020; RUEDA et al., 2010).

No Teste do Labirinto aquático de Morris não ocorreu diferença significativa em ANOVA para a administração de memantina na redução da curva de aprendizado nos camundongos Ts65Dn (RUEDA et al., 2010). Esse teste é útil na testagem da memória espacial, a qual envolve componentes como a memória de curto prazo, longo prazo e habilidades de cognição. Os receptores NMDA são alvos da ação da memantina, os quais apresentam papéis fundamentais na memória espacial, podendo ser avaliados por meio do teste do Labirinto aquático de Morris (DUDA et al., 2016; SAAB et al., 2011). A administração de memantina mostrou ser benéfica para esse parâmetro quando a plataforma era visível, ao mostrar significância no teste post hoc corrigidos por Bonferroni. Dessa forma, os animais atingiam a plataforma em menor tempo demonstrando aprendizado (RUEDA et al., 2010). Outros estudos apresentaram discrepância para esse parâmetro, em que para a plataforma visível, os camundongos mutantes duplos APP/PS1 não atingiram a plataforma visível em menor tempo (MINKEVICIENE; BANERJEE; TANILA, 2004). Essa diferença pode ocorrer em decorrência da diferença no modelo utilizado e a dosagem. A velocidade de natação não demonstrou melhoras com o tratamento (RUEDA et al., 2010).

O teste do Labirinto de Braços Radiais Win-Stay Water (WRAM) é um protocolo útil na avaliação da memória de trabalho, de referência e a memória espacial dependentes do hipocampo (AGNEW, 2018; DE LUCA; SOMINSKY; SPENCER, 2016; RAMOS, 2009; SCHMIDT et al., 2007). A administração de memantina demonstrou ser benéfica nos camundongos modificados para SD, ao diminuir a quantidade dos erros desses animais comparadas com os animais que não receberam nenhuma dose. A droga demonstrou corrigir em partes as deficiências na aprendizagem espacial e de memória, mas não a nível dos animais normossômicos (LOCKROW et al., 2011). A memantina, em outros estudos em ratos com DA e idosos, já havia demonstrado benefício sobre a memória de referência em outras atividades espaciais, consistentes com os resultados desse estudo (BARNES; DANYSZ; PARSONS, 1996; MINKEVICIENE; BANERJEE; TANILA, 2004). Os mecanismos para os quais a memantina facilita a plasticidade sináptica do hipocampo, e consequente melhora no aprendizado espacial, ainda não são claros (BARNES; DANYSZ; PARSONS, 1996).

A administração de memantina, em longo prazo e agudamente, sobre a tarefa de reconhecimento de objetos novos mostrou benefício sobre esse parâmetro. Esses camundongos Ts65Dn passaram a ter preferência pelos novos objetos, o que não era visto anteriormente (LOCKROW et al., 2011). O NOR consiste em um teste que o camundongo é exposto visualmente a dois objetos iguais e em seguida, um deles é substituído por um novo objeto. O roedor deverá explorar o novo objeto, caso se lembre do objeto previamente explora-

do, pois possui preferência inata pela novidade. Consiste em um teste eficiente na avaliação da memória e para o teste de diferentes fases do aprendizado (LUEPTOW, 2017). Os resultados, ao avaliar a DA, sugerem que isso ocorre devido os receptores de NMDA serem capazes de realizar alterações na plasticidade sináptica, como as que envolvem o aprendizado, sendo a ativação de tais receptores importante para a memória de reconhecimento. O excesso de ativação ou inibição compromete a plasticidade sináptica, no entanto a memantina é capaz de reduzir a atividade patológica desses receptores, sem prejudicar sua atividade fisiológica. Esse possível mecanismo é responsável pelo benefício dela no NOR (PITSIKAS; SAKELLARIDIS, 2007).

O BDNF é uma neurotrofina responsável pelo processos envolvidos no desenvolvimento e na função cerebral normal, sendo expresso pelos neurônios glutamatérgicos principalmente no córtex e no hipocampo (COLUCCI-D'AMATO; SPERANZA; VOLPICELLI, 2020). Estudos indicam que ele possui relação com a neurogênese hipocampal, sendo importante na regulação das sinapses, bem como na potenciação de longo prazo (COLUCCI-D'AMATO; SPERANZA; VOLPICELLI, 2020; MATTSON et al., 2018). A memantina se mostrou benéfica ao ser administrada nos camundongos Ts65Dn sobre os níveis de BDNF melhorando o desempenho de tarefas cognitivas (BIMONTE-NELSON et al., 2003; LOCKROW et al., 2011). Essa melhora nos níveis de BDNF, pelo tratamento, ainda permanece obscuro, e seu provável mecanismo decorre do efeito do bloqueio do receptor NMDA nos camundongos Ts65Dn (FRANKIEWICZ; PARSONS, 1999).

O nível do receptor de alta afinidade TrkA, que é útil na avaliação do tamanho das células colinérgicas no prosencéfalo basal, e em consequência avalia os efeitos neuroprotetores da degeneração colinérgica (BFCN), não mostrou benefício com a administração da memantina. Logo, o tratamento não possibilitou minimizar a atrofia de BFCN nesses camundongos (LOCKROW et al., 2011).

O marcador pan-microglial CD45 não foi benéficamente melhorado com a administração da memantina. Esse marcador é útil na avaliação da ativação microglial no hipocampo, indicando patologia inflamatória no cérebro desses animais. A administração crônica do medicamento não reverteu a neuroinflamação nos animais modificados para SD (LOCKROW et al., 2011; SCHOLTZOVA et al., 2008).

Camundongos tratados com memantina não mostraram neuroproteção sobre os neurônios TH-positivos no Locus Coeruleus (LC). A degeneração do LC é vista na SD bem como na doença de Alzheimer e na doença de Parkinson, repercutindo na diminuição capacidade de memória (LOCKROW et al., 2011; ZAROW et al., 2003). Logo, a administração da memantina no grupo Ts65Dn não reverteu a degeneração do LC vista na SD (LOCKROW et al., 2011).

Resultado da análise densitométrica da região do cornu ammonis hipocampal (CA1), demonstra que a memantina não exerceu benefícios para expressão de Cal 28k e desse modo não possibilitou a neuroproteção dessa região. (9'). A Calbindina D-28k consiste em uma proteína de ligação ao cálcio responsável pela regulação desse íon, o qual é fundamental para as sinapses e sinalização celular (SILVA et al., 2022). Os camundongos Ts65Dn possuem redução de Cal 28k em comparação com os animais normossômicos e o tratamento com a memantina não foi capaz de restaurar esse parâmetro e levar a neuroproteção (HUNTER; BACHMAN; GRANHOLM, 2004; LOCKROW et al., 2011). A compreensão dos genes em desequilíbrio de dosagem e o fenótipo da SD tem conduzido muitos estudos a nível do proteoma e transcriptoma (GARDINER, 2004; VILARDELL et al., 2011). Nesse sentido, seu entendimento permite a construção de

alvos farmacológicos de relevância para a criação de novas terapias (EMIDIO et al., 2016). O entendimento das proteínas expressas após o tratamento com a memantina é útil na compreensão da eficácia do medicamento nos processos moleculares de aprendizagem e de memória. As proteínas descritas para o estudo selecionado foram as que apresentaram maior relevância, com aumentos e diminuições de maior significância (AHMED et al., 2014).

Na análise do hipocampo, para a fração do núcleo, a memantina sozinha foi responsável pelo aumento de 8 componentes da Via MAPK, dentre as quais incluem: ELK, pERK1/2, BRAF, pPKCA/B, JNK, pCAMKII, PKCA e pJNK. Para o aprendizado normal, há aumento de 13 componentes. A via MAPK está envolvida na construção da memória de longo prazo (BERMAN et al., 1998; BESNARD et al., 2011). ELK é o fator complexo ternário (TFC), o qual é fosforilado pela via MAPK, e sua expressão no sistema nervoso central está relacionada a esse fator de transcrição ao translocar para o núcleo fará a remodelação da cromatina, diferenciação neuronal e transcrição do elemento de resposta do soro (BESNARD et al., 2011). No hipocampo, aumento de ELK esteve relacionado ao aprendizado de evitação de uma tentativa (BESNARD et al., 2011; CAMMAROTA et al., 2000). No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer a relação causal entre essa fosforilação e plasticidade neuronal e o processo de aprendizagem (BESNARD et al., 2011). pERK1/2 é uma quinase 1 e 2 regulada por sinal extracelular, pertencente a família MAPK, estando envolvido em uma diversidade de processos neurais como a formação da memória, aprendizado e formação de progenitores neurais. No sistema nervoso adulto é ativada em resposta a atividade sináptica e é necessária para a memória de reconhecimento (DAVIS; LAROCHE, 2006; SANANBENESI, 2002).

BRAF /B-raf é a mais importante Raf quinase do tecido cerebral, com importante papel na memória, aprendizado e plasticidade sináptica. Foi visto que sua expressão, no hipocampo de adultos, é necessário para o aprendizado dependente do hipocampo, plasticidade sináptica e potencialização de longo prazo (LTP) (CHEN et al., 2006). pPKCA/B consiste em uma família de quinases, em que a fosforilação das isoformas de A e B é aumentada durante a aprendizagem no hipocampo. Seu papel envolve a formação da memória espacial, em que a PKC regula a secreção de neurotransmissores, a função do receptor dos neurotransmissores e sua expressão genética (BEN-ARI; ANIKSZTEJN; BREGESTOVSKI, 1992; BONINI et al., 2007; KLESCHEVNIKOV; ROUTTENBERG, 2001; MACEK; SCHAFFHAUSER; CONN, 1998; MALENKA; MADISON; NICOLL, 1986; MANSEAU; SOSSIN; CASTELLUCCI, 1998; MEBERG et al., 1993). JNK, e sua forma ativa fosforilada pJNK, denominada quinases N-terminais c-Jun, é uma enzima de sinalização celular de importância na regulação celular (expressão genética, proliferação celular e apoptose), muito relacionada a enfermidades neurodegenerativas no tecido cerebral (SHERRIN; BLANK; TODOROVIC, 2011; WILLSEY et al., 2016). Outras ações de JNK são descritas, com um papel na consolidação da memória por meio do aprendizado associativo por condições de estresse e básicas (SHERRIN; BLANK; TODOROVIC, 2011). No hipocampo, pCAMKII, na sua forma ativa fosforilada tem papel importante na formação da memória, aprendizado e na LTP (COULTRAP; BAYER, 2012).

Quando se associa a memantina ao protocolo CFC, que é útil na avaliação da capacidade de aprendizado e lembrança frente à relação entre o ambiente e experiências aversivas, observa-se a elevação de

parte das proteínas que foram estimuladas pela memantina sozina (SHOJI et al., 2014). A elevação de pPKCG é específica para essa associação, sendo que pPKCG um isótipo de PKC gama na forma ativa fosforilada, e está relacionada a plasticidade neuronal, LTP, depressão de longo prazo (LTD) (CODAZZI et al., 2006; SAITO; SHIRAI, 2002).

Na análise hipocampal, para a via MTOR, foi visto que a administração de memantina resultou no aumento das proteínas GSK3B e pS6. GSK3B está envolvido na reconsolidação da memória no cérebro de camundongos adultos e plasticidade sináptica (KIMURA et al., 2008; PEINEAU et al., 2007). Os estudos demonstram que pS6, que corresponde a S6 fosforilada, desempenha papel importante na síntese de proteínas, sobrevivência celular e formação de sinapses para o desenvolvimento do cérebro. Foi relatado envolvimento da fosforilação de pS6 regulando o controle da tradução no sistema nervoso, porém os estudos ainda são controversos, necessitando de melhores estudos. Foi verificado elevação de S6 apenas com a administração do medicamento (AHMED et al., 2014; BIEVER; VALJENT; PUIGHERMANAL, 2015; LI et al., 2015). Quando há a associação entre o estímulo de aprender e a memantina outros níveis de proteínas são verificados, como o aumento em AMPKA, P70S6 e pGSK3B-ser9. A elevação na função de AMPKA, na região do CA1 hipocampal, regula de modo negativo a construção da memória contextual de medo e também da plasticidade estrutural. De maneira contrária, para a associação da droga e o estímulo de aprender no camundongo Ts65Dn, houve elevação em AMPKA, que seu aumento inibe a formação da memória do medo de longo prazo (HAN et al., 2016; POTTER et al., 2010). P70S6 é uma proteína em que sua função biológica é necessária para a indução da síntese proteica que gerará a plasticidade sináptica (CAMMALLERI et al., 2003; HU et al., 2010). O aumento de pGSK3B-ser9, em que GSK-3 β é fosforilado em Ser9, prejudica a LTP levando a um déficit na memória espacial (HOOPER et al., 2007). Nesse aspecto, o estudo da função dessas proteínas, para a associação entre a memantina e o estímulo de aprender, leva ao aumento de proteínas relacionadas à falha no aprendizado.

A administração da memantina, na fração citosólica da via MTOR nos ratos Ts65Dn foi responsável pela diminuição dos níveis de S6 e pS6 (AHMED et al., 2014). Isso pode ocorrer porque parte de S6 citoplasmático é translocado para a fração nuclear (AHNSTEDT et al., 2011). A via MTOR está localizada tanto no núcleo, quanto no citoplasma em que sua distribuição se difere entre elas, em o nível de S6 e pS6 difere entre essas frações (ROSNER; HENGSTSCHLAGER, 2008). A elevação da atividade de pERK contribui para a LTP (BEVILAQUA; CAMMAROTA, 2018). Na associação do CFC a memantina, na fração citosólica o resultado demonstrou aumento de pCAMKII, que como discutido anteriormente, tem papel na memória, aprendizado e LTP (COULTRAP; BAYER, 2012).

A administração de memantina não alterou na fração citosólica da via MTOR o nível de BRAF, mas aumentou o nível de pBRAF, sua forma fosforilada ativada, o qual tem funções sobre a memória, aprendizado e plasticidade sináptica (AHNSTEDT et al., 2011; CHEN et al., 2006). Ainda para o citosol, alterações específicas para a memantina e CFC são vistas, em que há aumento de pMEK, desempenhando papel imprescindível na memória e no aprendizado, e aumento em ELK, o qual desempenha papel no aprendizado de evitação de uma tentativa (AHMED et al., 2014; BESNARD et al., 2011; CAMMAROTA et al., 2000; SHALIN et al., 2004).

EGR1 é um fator de transcrição, dependente da ativação de NMDA, em que o aumento de seus níveis se relaciona a alterações na transcrição de longo prazo, levando a aquisição e/ou manutenção do aprendizado de uma habilidade motora (BRITO et al., 2022). ARC, por sua vez relaciona-se a todas as formas de plasticidade sináptica como na memória espacial de longo prazo, LTP, LTD, plasticidade homeostática (BRAMHAM et al., 2010; KORB; FINKBEINER, 2011; MESSAOUDI et al., 2007; MINATOHARA; AKIYOSHI; OKUNO, 2016; PEEBLES et al., 2010; PLATH et al., 2006; YAMADA et al., 2011). A administração da droga e o CFC elevou esses dois parâmetros na fração citosólica, em que ARC teve elevação apenas para esta associação (AHMED et al., 2014).

Ao se analisar a resposta das subunidades do receptor NMDA e de suas proteínas relacionadas, a administração de memantina foi responsável pela diminuição das proteínas NR1, NR2A e PSD95 na fração da membrana. NR1 e NR2 é subunidade do receptor NMDA. NR1 apresenta função sobre a plasticidade sináptica na aprendizagem, memória (BAZZARI; PARRI, 2019). NR2A apresenta função sobre a potencialização sináptica, plasticidade sináptica (JONES, 2004; TANG et al., 1999). PSD95, por sua vez tem relação com a força sináptica e estabilização das sinapses após as fases iniciais da potencialização sináptica (EHRlich et al., 2007; SCHLÜTER; XU; MALENKA, 2006). Pelos resultados, sobre o receptor NMDA, a administração de memantina diminuiu as proteínas associadas, que contrariam o favorecimento da plasticidade sináptica. Quando se associa o medicamento ao CFC, observa-se elevação dos níveis de GLUR3 e GLUR4 na membrana. GLUR3 e GLUR4, que são subunidades do receptor de glutamato, estão envolvidos na transmissão sináptica excitatória com mais rapidez (ADESNIK; NICOLL, 2007; AHMED et al., 2014). A função das subunidades AMPAR estão relacionadas a transmissão excitatória com rapidez, sendo um dos principais responsáveis pela memória e aprendizado (GUGUSTEA; JIA, 2021). A administração da memantina não provocou alterações nos níveis dessa subunidade, para os camundongos Ts65Dn (AHMED et al., 2014).

Outras mudanças no receptor NMDA foram vistas com a administração de memantina. A sua administração associada ao CFC foi responsável por elevação modesta nos níveis de BDNF na membrana. O BDNF tem função na regulação das sinapses de curto, de longo prazo, processo cognitivo e comportamentos que exigem complexidade (LU; NAGAPPAN; LU, 2014). Essa associação não provocou grandes elevações no BDNF (AHMED et al., 2014). Para a memantina isolada, na fração do citosol, quanto em associação ao CFC ela elevou os níveis de fosfo-NUMB e pNUMB, sua forma fosforilada, foi elevada na membrana. Os níveis de NUMB não foram estudados no processo de aprendizado e memória, mas sua relação esteve associada a morfogênese da espinha dendrítica (protuberância nas membranas onde existem as sinapses excitatórias) (NISHIMURA et al., 2006). TIAM1 é uma proteína envolvida na regulação de sinapses glutamatérgicas nos neurônios do hipocampo, a qual foi aumentada no citosol e reduzida na membrana sobre a administração de memantina (AHMED et al., 2014; RAO; KAY; HERRING, 2019). Estudos demonstraram que a relação entre o complexo CaMKII-Tiam1 é imprescindível ao armazenamento da memória e que TIAM1 sofre translocação do citosol para a membrana dependente do tempo, o que pode explicar essa elevação no citoplasma e diminuição na membrana, sendo ele mais expresso no citoplasma (BUCHANAN et al., 2000; FLEMING et al., 2004; KOJIMA et al., 2019).

No córtex, a administração da memantina associada ao CFC foi responsável pela elevação mais específica nos níveis de GLUR3 e GLUR4 que estão relacionados a transmissão sináptica excitatória com mais rapidez (ADESNIK; NICOLL, 2007; AHMED et al., 2014).

O tratamento com memantina não foi eficaz em reverter as anormalidades no hipocampo dos camundongos Ts65Dn a nível molecular. De maneira contrária, a memantina resultou na elevação das anormalidades comparadas com a aplicação de solução salina nos animais Ts65Dn (MACLEOD et al., 2015). Estudos anteriores para a DA demonstraram que a memantina desempenha respostas proteicas complexas no cérebro, afetando de maneira diferente as regiões do cérebro (ZHOU et al., 2019). No hipocampo, ao contrário do que foi encontrado nesse estudo, para o tratamento com memantina em camundongo modificado para a DA (camundongos do tipo 3×Tg-AD ou WT), foi vista regulação positiva a nível proteômico. Essa disparidade, ao instituir o tratamento com a memantina, pode ser decorrente do modelo animal utilizado (AHMED et al., 2015; ZHOU et al., 2019).

A administração de memantina no córtex reverteu parcialmente as alterações proteicas no citosol e no núcleo (AHMED et al., 2015). Os resultados encontrados sugerem que a memantina tem efeito maior no córtex do que no hipocampo, atuando significativamente sobre mais proteínas, no entanto, não é relatado em outros estudos se isso foi responsável pela reversão das alterações proteicas mencionadas (AHMED et al., 2015; ZHOU et al., 2019).

A memantina é usada para tratamento de doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer (DA) (RÍO-SANCHO, 2020) e o seu possível uso na SD originou-se de informações funcionais em uma proteína codificada por Hsa21, reguladora da calcineurina1, RCAN1. A RCAN1 demonstrou modular a atividade da proteína fosfatase Ca^{++} -calmodulina, calcineurina (CaN), um heterodímero composto por uma subunidade catalítica A (CaNA) (ROTHERMEL, 2003) e que após a administração do medicamento, resultou no resgate do aprendizado e elevação nos níveis de CaNA na fração nuclear no hipocampo (AHMED et al., 2015), possivelmente decorrente da diminuição na desfosforilação do CaN e que pode resultar na diminuição da probabilidade de abertura de NMDAR (LIEBERMAN; MODY, 1994) e neurotoxicidade (COSTA; SCOTT-MCKEAN; STASKO, 2008). Entretanto, os resultados dos estudos são conflitantes, pois outro estudo relata que a diminuição de CaN está associada à melhora na formação da memória e plasticidade sináptica (HAVEKES et al., 2006).

A administração da memantina, na fração nuclear do hipocampo, diminuiu o nível da proteína H3AcK9 (AHMED et al., 2015). Essa proteína está associada a transcrição ativa, no início da transcrição e recruta proteínas para os próximos passos durante a transcrição, no entanto, faltam estudos para a melhor compreensão do papel dessa proteína no hipocampo e seu papel funcional ainda é pouco entendido (GATES et al., 2017).

O nível de BRAF foi aumentado na fração nuclear do córtex para o tratamento para o aprendizado resgatado. Isso corrobora com o papel dessa proteína na memória, aprendizado e plasticidade sináptica (AHMED et al., 2015; CHEN et al., 2006). No entanto, os estudos selecionados apontam que mesmo com essas alterações/aprendizado resgatado, a memantina não produziu efeitos sobre o aprendizado, que ocorreu em virtude de o nível da linha de base estar dentro da normalidade. Além disso, no aprendizado resgatado

(RL), a farmacoterapia com a memantina não fez a correção das anormalidades de início, tampouco levou às respostas dinâmicas vistas em NL (aprendizado normal), no entanto resultou na normalização dos perfis no final, no resgate do aprendizado (AHMED et al., 2015).

Para a fração nuclear do córtex cerebral, foi verificado aumento no nível de BRAF com a administração de memantina e variou entre ~50% e ~80% para o RL (AHMED et al., 2015). Esse resultado do gene individual SFARI (BRAF), das vias de sinalização neurovascular listadas pelo SFARI (MAP quinase, receptor de célula B e sinalização de interleucina), sinalização Hedgehog e vias de angiogênese demonstram poder influenciar comportamentos adaptativos, motores e de ansiedade (JAGADAPILLAI et al., 2022).

Avaliando ainda o parâmetro de padrão respostas de proteínas, no córtex, em sua fração citosólica, é visto resposta indireta da droga no RL, com aumento nos níveis de CASP3 (AHMED et al., 2015). Como enzima efetora central da cascata apoptótica, nos cérebros de pacientes com síndrome de Down, fornece evidência direta de morte neuronal apoptótica com frequência compatível com a progressão da degeneração neuronal (STADELMANN et al., 1999).

Em relação ao parâmetro AKT, os resultados revelaram aumento em RL, o qual se somará aos níveis de base, aproximando-se da resposta em NL. Em relação ao hipocampo, em sua fração nuclear, como ação direta à memantina, o nível de pJNK aumenta em 40%, sem efeito sobre RL. Ainda no hipocampo, resultados mais complexos em relação ao fármaco é visto. Em PP2A- na fração nuclear- e em IL1B- na fração do citosol- em que a ação farmacológica B-tm (condições iniciais, trissomia em que t-SC-mem é comparado a t-SC-sal) produz alterações opostas a NL. No hipocampo é verificado 20 respostas como essas produzida pela memantina e no córtex há 40 delas (AHMED et al., 2015).

Na avaliação das proteínas presentes no Hsa21 gene DYRK1A é aumentado em níveis de base no hipocampo em sua fração do citosol e no córtex ela é elevada na fração do citosol e nuclear. A Memantina corrige esse nível alto no córtex, no citosol, e nas demais frações ela aumenta mais os níveis no RL. A proteína ITSN1, (proteína de endocitose multidomínio) no córtex, em sua fração nuclear aumentou no RL. Em relação ao hipocampo, os níveis de ITSN1 ainda foram altos, no entanto, sem efeito da Memantina, exceto indiretamente um decréscimo em RL presente na fração de membrana (AHMED et al., 2015).

4.3 Qualidade dos Estudos e Risco de Viés

Após aplicação de critérios explícitos para a exclusão e inclusão, foram selecionados seis estudos. A avaliação dos estudos em animais foi realizada usando a ferramenta para avaliar o risco de viés e outros critérios metodológicos de estudos publicados em animais (KRAUTH; WOODRUFF; BERO, 2013a) e demonstrou que todos eles apresentam baixo risco de viés, o que indica que os estudos possuem a qualidade necessária para serem incluídos nessa revisão sistemática com meta-análise. O viés de publicação é um problema considerável para a validade da meta-análise, pois estudos com resultados significativos ou positivos são mais propensos a serem publicados do que estudos com resultados não significativos (YAZDI et al., 2017). Esta revisão sistemática revisou e incluiu estudos com resultados benéficos ou não benéficos da

administração de memantina. Revisões sistemáticas de estudos em animais são mais vulneráveis ao viés de publicação do que as de ensaios clínicos (LEE et al., 2019; TER RIET et al., 2012). Estudos não significativos ou desfavoráveis podem não ser publicados por razões comerciais (TANAKA et al., 2003). O I² encontrado na meta-análise foi alto, demonstrando a heterogeneidade dos estudos e vários fatores, dentre eles a diferença na duração do período experimental, concentração administrada de memantina, período experimental dos animais no início do experimento podem ter contribuído para isso.

5. Limitações e pontos fortes

Os pontos fortes desta revisão sistemática relacionam-se à ampla estratégia de pesquisa bibliográfica usada para identificar as evidências disponíveis para responder à questão da pesquisa.

Esta é uma revisão sistemática que avalia sistematicamente estudos em animais Ts65Dn, machos, publicados, e os efeitos da administração da memantina, como potencial tratamento de parâmetros relacionados a síndrome de Down.

Além disso, o desenvolvimento e fundamentação desta revisão foram baseados na inclusão de estudos avaliados por meio de rigorosas ferramentas de qualidade metodológica. No entanto, as revisões sistemáticas estão sujeitas a certas desvantagens e limitações metodológicas que devem ser reconhecidas à luz dos achados. Nessa revisão sistemática apenas um parâmetro foi meta-analisado, devido ao baixo número de estudos e formato de apresentação dos dados ou mesmo a supressão dos dados obtidos, o que impossibilitou a análise quantitativa.

6. Implicações e pesquisas futuras

A memantina é um medicamento usado para retardar a progressão da doença de Alzheimer moderada a grave e é ingerido por via oral e atua nos receptores NMDA, funcionando como bloqueador dos poros desses canais iônicos. Nesse estudo meta-analisamos os efeitos da memantina no teste de campo aberto em camundongos machos Ts65Dn, não obtivemos resultado significativo. O número limitado de estudos não permite tirar conclusões definitivas sobre o impacto desse composto na correção das alterações cognitivas, motoras e morfológicas observadas em decorrência da SD. Portanto, mais estudos deverão ser feitos para aumentar o nível de evidência e assim poder recomendar o uso rotineiro de memantina para fins de recuperação das alterações observadas nos portadores de síndrome de Down.

7. Conclusão

A meta-análise do comportamento exploratório em campo aberto não revelou efeito benéfico do uso da memantina em camundongos Ts65Dn, como modelo experimental de SD. O pequeno número de estudos não permite fornecer evidências suficientes para tirar conclusões sobre a eficácia ou segurança, necessitando que novos ensaios rigorosos e com poder estatístico suficiente possam permitir que

aumentemos as evidências dos efeitos do uso da memantina em relação a parâmetros comportamentais e moleculares.

Contribuições dos autores

As responsabilidades dos autores eram as seguintes - LFR, JAMS, LWO e HBN: conceberam o estudo; LFR, JAMS, HRSC: conduziram a pesquisa bibliográfica e realizaram a extração de dados e avaliação da qualidade; LRF, JAMS e HBN: escreveram o rascunho do manuscrito; LFR, JAMS, LWO e HBN: revisão crítica fornecida; HBN: é o fiador e tem a responsabilidade primária pelo conteúdo final; e todos os autores: leram e aprovaram o manuscrito final.

Conflitos de interesse

Os autores não relatam quaisquer interesses financeiros ou possíveis conflitos de interesse.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa PIBIC para a realização dessa pesquisa.

Referências bibliográficas

- ADESNIK, H.; NICOLL, R. A. Conservation of Glutamate Receptor 2-Containing AMPA Receptors during Long-Term Potentiation. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 17, p. 4598–4602, 25 abr. 2007.
- AGNEW, J. **Win-Shift and Win-Stay Protocol on the Radial Arm Maze**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://conductscience.com/maze/win-shift-win-stay-protocol-radial-arm-maze/>>. Acesso em: 21 jul. 2023.
- AHMED, M. M. et al. Protein Profiles Associated With Context Fear Conditioning and Their Modulation by Memantine. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 4, p. 919–937, abr. 2014.
- AHMED, M. M. et al. Protein Dynamics Associated with Failed and Rescued Learning in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119491, 20 mar. 2015.
- AHNSTEDT, H. et al. Human cerebrovascular contractile receptors are upregulated via a B-Raf/MEK/ERK-sensitive signaling pathway. **BMC Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 5, 11 dez. 2011.
- ANTONARAKIS, S. E. et al. Down syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 9, 6 fev. 2020.
- ARAKAWA, H.; ERZURUMLU, R. S. Role of whiskers in sensorimotor development of C57BL/6 mice. **Behavioural Brain Research**, v. 287, p. 146–155, 1 jul. 2015.
- AUSTENG, M. E. et al. Otitis media with effusion in children with in Down syndrome. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 8, p. 1329–1332, ago. 2013.

- BARNES, C. A.; DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Effects of the Uncompetitive NMDA Receptor Antagonist Memantine on Hippocampal Long-term Potentiation, Short-term Exploratory Modulation and Spatial Memory in Awake, Freely Moving Rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 565–571, 1 mar. 1996.
- BAZZARI, A.; PARRI, H. Neuromodulators and Long-Term Synaptic Plasticity in Learning and Memory: A Steered-Glutamatergic Perspective. **Brain Sciences**, v. 9, n. 11, p. 300, 31 out. 2019.
- BEN-ARI, Y.; ANIKSZTEJN, L.; BREGESTOVSKI, P. Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. **Trends in Neurosciences**, v. 15, n. 9, p. 333–339, set. 1992.
- BERMAN, D. E. et al. Specific and Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades by Unfamiliar Taste in the Insular Cortex of the Behaving Rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 23, p. 10037–10044, 1 dez. 1998.
- BESNARD, A. et al. Elk-1 a Transcription Factor with Multiple Facets in the Brain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 5, n. MAR, p. 9281, 16 mar. 2011.
- BEVILAQUA, L. R. M.; CAMMAROTA, M. PERK, mTORC1 and eEF2 interplay during long term potentiation. **Journal of Neurochemistry**, v. 146, n. 2, p. 119–121, 1 jul. 2018.
- BIEVER, A.; VALJENT, E.; PUIGHERMANAL, E. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. DEC, 16 dez. 2015.
- BIMONTE-NELSON, H. A. et al. Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome. **Behavioural Brain Research**, v. 139, n. 1–2, p. 47–57, 17 fev. 2003.
- BONINI, J. S. et al. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**, v. 147, n. 1, p. 37–45, 15 jun. 2007.
- BRAMHAM, C. R. et al. The Arc of synaptic memory. **Experimental Brain Research**, v. 200, n. 2, p. 125–140, 19 jan. 2010.
- BRITO, V. et al. Hippocampal Egr1 -Dependent Neuronal Ensembles Negatively Regulate Motor Learning. **The Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 27, p. 5346–5360, 6 jul. 2022.
- BUCHANAN, F. G. et al. Translocation of the Rac1 Guanine Nucleotide Exchange Factor Tiam1 Induced by Platelet-derived Growth Factor and Lysophosphatidic Acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9742–9748, 31 mar. 2000.
- CAMMALLERI, M. et al. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70 S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14368–14373, 25 nov. 2003.
- CAMMAROTA, M. et al. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research**, v. 76, n. 1, p. 36–46, 10 mar. 2000.
- CAVALCANTE, K. M. H. **Efeitos do ambiente enriquecido sobre a memória aversiva e a imunorreatividade para ZIF-268 e tirosina hidroxilase no sistema mesocorticolímbico de ratos.** [s.l.] Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 15 dez. 2017.
- CHEHIMI, L. et al. Chronic exposure to mercuric chloride during gestation affects sensorimotor

- development and later behaviour in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 234, n. 1, p. 43–50, 1 set. 2012.
- CHEN, A. P. et al. Forebrain-specific knockout of B-raf kinase leads to deficits in hippocampal long-term potentiation, learning, and memory. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 1, p. 28–38, 1 jan. 2006.
- CHEN, G.-D. et al. Hearing impairment in murine model of Down syndrome. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 936128, 4 ago. 2022.
- CHOI, J. H. K. et al. Age-dependent dysregulation of brain amyloid precursor protein in the Ts65Dn Down syndrome mouse model. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 6, p. 1818–1827, 1 set. 2009.
- CIPRIANI, P.; BRUNI, G. Relations between sensorimotor attainments and development of language comprehension in retarded children. **Italian journal of neurological sciences**, v. Suppl 5, p. 133–41, abr. 1986.
- CODAZZI, F. et al. Synergistic Control of Protein Kinase C γ Activity by Ionotropic and Metabotropic Glutamate Receptor Inputs in Hippocampal Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 13, p. 3404–3411, 29 mar. 2006.
- COLUCCI-D'AMATO, L.; SPERANZA, L.; VOLPICELLI, F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 7777, 21 out. 2020.
- COSTA, A. C. S. et al. Safety, efficacy, and tolerability of memantine for cognitive and adaptive outcome measures in adolescents and young adults with Down syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. **The Lancet Neurology**, v. 21, n. 1, p. 31–41, 1 jan. 2022.
- COSTA, A. C. S.; SCOTT-MCKEAN, J. J.; STASKO, M. R. Acute Injections of the NMDA Receptor Antagonist Memantine Rescue Performance Deficits of the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome on a Fear Conditioning Test. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 7, p. 1624–1632, 15 jun. 2008.
- COSTA, A.; WALSH, K.; DAVISSON, M. Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. **Physiology & Behavior**, v. 68, n. 1–2, p. 211–220, 1 dez. 1999.
- COULTRAP, S. J.; BAYER, K. U. CaMKII regulation in information processing and storage. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 10, p. 607–618, out. 2012.
- DAVIS, S.; LAROCHE, S. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. **Genes, Brain and Behavior**, v. 5, n. SUPPL. 2, p. 61–72, jun. 2006.
- DE LUCA, S.; SOMINSKY, L.; SPENCER, S. Delayed Spatial Win-shift Test on Radial Arm Maze. **BIO-PROTOCOL**, v. 6, n. 23, 2016.
- DEAN, R. L. et al. Age-related differences in behavior across the life span of the C57BL/6J mouse. **Experimental Aging Research**, v. 7, n. 4, p. 427–451, 27 dez. 1981.
- DELABAR, J.-M. et al. Changing Paradigms in Down Syndrome: The First International Conference of the Trisomy 21 Research Society. **Molecular Syndromology**, v. 7, n. 5, p. 251–261, 1 out. 2016.
- DIERSSSEN, M. et al. Building the Future Therapies for Down Syndrome: The Third International Conference of the T21 Research Society. **Molecular Syndromology**, v. 12, n. 4, p. 202–218, 1 jul. 2021.
- DU, X. et al. Research progress on the role of type i vesicular glutamate transporter (VGLUT1) in nervous system diseases. **Cell and Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 4 mar. 2020.

- DUDA, W. et al. MK-801 and memantine act differently on short-term memory tested with different time-intervals in the Morris water maze test. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p. 15–23, 15 set. 2016.
- EHRLICH, I. et al. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 10, p. 4176–4181, 6 mar. 2007.
- EMIDIO, N. B. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3 e 4, p. 101–111, 19 abr. 2016.
- ESCORIHUELA, R. M. et al. A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. **Neuroscience Letters**, v. 199, n. 2, p. 143–146, 20 out. 1995.
- FAWCETT, T. J. et al. Automated classification of acoustic startle reflex waveforms in young CBA/CAJ mice using machine learning. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 344, p. 108853, 1 out. 2020.
- FLEMING, I. N. et al. Inositol phospholipids regulate the guanine-nucleotide-exchange factor Tiam1 by facilitating its binding to the plasma membrane and regulating GDP/GTP exchange on Rac1. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 3, p. 857–865, 15 set. 2004.
- FRANKIEWICZ, T.; PARSONS, C. G. Memantine restores long term potentiation impaired by tonic N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor activation following reduction of Mg²⁺ in hippocampal slices. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 9, p. 1253–1259, 1 set. 1999.
- GARDINER, K. Building protein interaction maps for Down's syndrome. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 3, n. 2, p. 142–156, 1 jan. 2004.
- GATES, L. A. et al. Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 35, p. 14456–14472, 1 set. 2017.
- GIL-LLARIO, M. D. et al. Development and psychometric properties of a self-report instrument for the assessment of sexual behaviour and concerns of people with mild intellectual disabilities (SEBECOMID-S). **Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities**, v. 35, n. 1, p. 134–142, 26 jan. 2022.
- GUGUSTEA, R.; JIA, Z. Genetic manipulations of AMPA glutamate receptors in hippocampal synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 194, p. 108630, 15 ago. 2021.
- GUPTA, M.; DHANASEKARAN, A. R.; GARDINER, K. J. Mouse models of Down syndrome: gene content and consequences. **Mammalian Genome**, v. 27, n. 11–12, p. 538–555, 18 dez. 2016.
- HAN, Y. et al. AMPK Signaling in the Dorsal Hippocampus Negatively Regulates Contextual Fear Memory Formation. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 7, p. 1849–1864, 9 jun. 2016.
- HANNEY, M. et al. Memantine for dementia in adults older than 40 years with Down's syndrome (MEADOWS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 379, n. 9815, p. 528–536, 11 fev. 2012.
- HAVEKES, R. et al. Differential involvement of hippocampal calcineurin during learning and reversal learning in a Y-maze task. **Learning & Memory**, v. 13, n. 6, p. 753–759, nov. 2006.
- HEAD, E. et al. Aging in Down Syndrome and the Development of Alzheimer's Disease Neuropathology. **Current Alzheimer Research**, v. 13, n. 1, p. 18–29, 7 dez. 2015.
- HERAULT, Y. et al. Rodent models in Down syndrome research: impact and future opportunities. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 10, p. 1165–1186, 1 out. 2017.

- HIGUERA, C.; GARDINER, K. J.; CIO, K. J. Self-Organizing Feature Maps Identify Proteins Critical to Learning in a Mouse Model of Down Syndrome. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129126, 25 jun. 2015.
- HOOPER, C. et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 81–86, 12 jan. 2007.
- HU, L. Y. et al. ATP-mediated protein kinase B Akt/mammalian target of rapamycin mTOR/p70 ribosomal S6 protein p70S6 kinase signaling pathway activation promotes improvement of locomotor function after spinal cord injury in rats. **Neuroscience**, v. 169, n. 3, p. 1046–1062, 1 set. 2010.
- HUNTER, C. L.; BACHMAN, D.; GRANHOLM, A.-C. Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome. **Annals of Neurology**, v. 56, n. 5, p. 675–688, 1 nov. 2004.
- ITO, K. et al. Memantine reduces the production of amyloid- β peptides through modulation of amyloid precursor protein trafficking. **European Journal of Pharmacology**, v. 798, p. 16–25, mar. 2017.
- JAGADAPILLAI, R. et al. Potential Cross Talk between Autism Risk Genes and Neurovascular Molecules: A Pilot Study on Impact of Blood Brain Barrier Integrity. **Cells**, v. 11, n. 14, p. 2211, 15 jul. 2022.
- JOHANSSON, B. B. Functional Outcome in Rats Transferred to an Enriched Environment 15 Days After Focal Brain Ischemia. **Stroke**, v. 27, n. 2, p. 324–326, fev. 1996.
- JONES, R. The highs and lows of synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 516–516, jul. 2004.
- KIMURA, T. et al. GSK-3 β Is Required for Memory Reconsolidation in Adult Brain. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, p. e3540, 28 out. 2008.
- KLEIN, S. L. et al. Characterization of sensorimotor performance, reproductive and aggressive behaviors in segmental trisomic 16 (Ts65Dn) mice. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 4, p. 1159–1164, 1 out. 1996.
- KLESCHEVNIKOV, A. M.; ROUTTENBERG, A. PKC activation rescues LTP from NMDA receptor blockade. **Hippocampus**, v. 11, n. 2, p. 168–175, 2001.
- KOJIMA, H. et al. The role of CaMKII-Tiam1 complex on learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 166, p. 107070, 1 dez. 2019.
- KORB, E.; FINKBEINER, S. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 11, p. 591–598, nov. 2011.
- KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l.] Methods Mol Biol, 2019. v. 1916p. 99–103.
- KRAUTH, D.; WOODRUFF, T. J.; BERO, L. Instruments for Assessing Risk of Bias and Other Methodological Criteria of Published Animal Studies: A Systematic Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 9, p. 985–992, set. 2013.
- KULAN, H.; DAG, T. In silico identification of critical proteins associated with learning process and immune system for Down syndrome. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0210954, 28 jan. 2019.
- LAIGNIER, M. R. et al. Down Syndrome in Brazil: Occurrence and Associated Factors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 22, p. 11954, 14 nov. 2021.
- LI, G. et al. S6 inhibition contributes to isoflurane neurotoxicity in the developing brain. **Toxicology**

Letters, v. 233, n. 2, p. 102–113, 4 mar. 2015.

LIEBERMAN, D. N.; MODY, I. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca^{2+} -dependent phosphatase. **Nature**, v. 369, n. 6477, p. 235–239, maio 1994.

LIGUZ-LECZNAR, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J. Vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the developing mouse barrel cortex. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 107–114, 7 abr. 2007.

LOCKROW, J. et al. Effects of long-term memantine on memory and neuropathology in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 610–622, 10 ago. 2011.

LU, B.; NAGAPPAN, G.; LU, Y. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2014. v. 220p. 223–250.

LUEPTOW, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 126, 30 ago. 2017.

MACEK, T. A.; SCHAFFHAUSER, H.; CONN, P. J. Protein Kinase C and A 3 Adenosine Receptor Activation Inhibit Presynaptic Metabotropic Glutamate Receptor (mGluR) Function and Uncouple mGluRs from GTP-Binding Proteins. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 16, p. 6138–6146, 15 ago. 1998.

MACLEOD, M. R. et al. Risk of Bias in Reports of In Vivo Research: A Focus for Improvement. **PLOS Biology**, v. 13, n. 10, p. e1002273, 13 out. 2015.

MALAK, R. et al. Motor skills, cognitive development and balance functions of children with Down syndrome. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 20, n. 4, p. 803–806, 2013.

MALENKA, R. C.; MADISON, D. V.; NICOLL, R. A. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. **Nature**, v. 321, n. 6066, p. 175–177, maio 1986.

MANSEAU, F.; SOSSIN, W. S.; CASTELLUCCI, V. F. Long-Term Changes in Excitability Induced by Protein Kinase C Activation in Aplysia Sensory Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 79, n. 3, p. 1210–1218, 1 mar. 1998.

MASUO, K.; ENOMOTO, K.; MAENO, T. Effects of memantine on the frog neuromuscular junction. **European Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 187–195, 4 nov. 1986.

MATSUNAGA, S. et al. The efficacy and safety of memantine for the treatment of Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 17, n. 10, p. 1053–1061, 3 out. 2018.

MATTSON, M. P. et al. Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 81–94, 11 fev. 2018.

MEBERG, P. J. et al. Protein kinase C and F1/GAP-43 gene expression in hippocampus inversely related to synaptic enhancement lasting 3 days. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 12050–12054, 15 dez. 1993.

MESSAOUDI, E. et al. Sustained Arc/Arg3.1 Synthesis Controls Long-Term Potentiation Consolidation through Regulation of Local Actin Polymerization in the Dentate Gyrus In Vivo. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 39, p. 10445–10455, 26 set. 2007.

MINATOHARA, K.; AKIYOSHI, M.; OKUNO, H. Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n.

JAN2016, p. 172311, 5 jan. 2016.

MINKEVICIENE, R.; BANERJEE, P.; TANILA, H. Memantine Improves Spatial Learning in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 2, p. 677–682, 1 nov. 2004.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **International Journal of Surgery**, v. 8, n. 5, p. 336–341, 2010.

MÖHLER, H. Cognitive enhancement by pharmacological and behavioral interventions: the murine Down syndrome model. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 8, p. 994–999, 15 out. 2012.

NISHIMURA, T. et al. Role of Numb in Dendritic Spine Development with a Cdc42 GEF Intersectin and EphB2. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 3, p. 1273–1285, 4 mar. 2006.

ONOGI, H. et al. Influence of Memantine on Brain Monoaminergic Neurotransmission Parameters in Mice: Neurochemical and Behavioral Study. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 5, p. 850–855, maio 2009.

PEEBLES, C. L. et al. Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 42, p. 18173–18178, 19 out. 2010.

PEINEAU, S. et al. LTP Inhibits LTD in the Hippocampus via Regulation of GSK3 β . **Neuron**, v. 53, n. 5, p. 703–717, 1 mar. 2007.

PITSIKAS, N.; SAKELLARIDIS, N. Memantine and recognition memory: Possible facilitation of its behavioral effects by the nitric oxide (NO) donor molsidomine. **European Journal of Pharmacology**, v. 571, n. 2–3, p. 174–179, 1 out. 2007.

PLATH, N. et al. Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and Memories. **Neuron**, v. 52, n. 3, p. 437–444, 9 nov. 2006.

POTTER, W. B. et al. Metabolic Regulation of Neuronal Plasticity by the Energy Sensor AMPK. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e8996, 1 fev. 2010.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 28 fev. 2003.

RAMOS, J. M. J. Remote spatial memory and the hippocampus: Effect of early and extensive training in the radial maze. **Learning & Memory**, v. 16, n. 9, p. 554–563, set. 2009.

RAO, S.; KAY, Y.; HERRING, B. E. Tiam1 is Critical for Glutamatergic Synapse Structure and Function in the Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 47, p. 9306–9315, 20 nov. 2019.

REINES, V. et al. Parental Perspectives on Pharmacological Clinical Trials: a Qualitative Study in Down Syndrome and Fragile X Syndrome. **Journal of Genetic Counseling**, v. 26, n. 6, p. 1333–1340, 24 dez. 2017.

RÍO-SANCHO, S. DEL. Memantine and Alzheimer's disease. In: **Diagnosis and Management in Dementia**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 511–527.

ROSNER, M.; HENGSTSCHLAGER, M. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 19, p. 2934–2948, 9 jul. 2008.

- ROTHERMEL, B. The Role of Modulatory Calcineurin-Interacting Proteins in Calcineurin Signaling. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 13, n. 1, p. 15–21, jan. 2003.
- RUEDA, N. et al. Memantine Normalizes Several Phenotypic Features in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 21, n. 1, p. 277–290, 8 jul. 2010.
- SAAB, B. J. et al. Memantine Affects Cognitive Flexibility in the Morris Water Maze. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 27, n. 3, p. 477–482, 29 nov. 2011.
- SAITO, N.; SHIRAI, Y. Protein Kinase C (PKC): Function of Neuron Specific Isozyme. **Journal of Biochemistry**, v. 132, n. 5, p. 683–687, 1 nov. 2002.
- SALIBA, I. et al. Down syndrome: An electrophysiological and radiological profile. **The Laryngoscope**, v. 124, n. 4, p. E141–E147, 1 abr. 2014.
- SANANBENESI, F. Phosphorylation of Hippocampal Erk-1/2, Elk-1, and p90-Rsk-1 during Contextual Fear Conditioning: Interactions between Erk-1/2 and Elk-1. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 463–476, nov. 2002.
- SANDERS, M. J.; WILTGEN, B. J.; FANSELOW, M. S. The place of the hippocampus in fear conditioning. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 217–223, 28 fev. 2003.
- SCARPINI, E.; SCHELTERNS, P.; FELDMAN, H. Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 9, p. 539–547, 1 set. 2003.
- SCHLÜTER, O. M.; XU, W.; MALENKA, R. C. Alternative N-Terminal Domains of PSD-95 and SAP97 Govern Activity-Dependent Regulation of Synaptic AMPA Receptor Function. **Neuron**, v. 51, n. 1, p. 99–111, 6 jul. 2006.
- SCHMIDT, A. T. et al. Dissociating the long-term effects of fetal/neonatal iron deficiency on three types of learning in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 475–482, jun. 2007.
- SCHOLTZOVA, H. et al. Memantine leads to behavioral improvement and amyloid reduction in Alzheimer's-disease-model transgenic mice shown as by micromagnetic resonance imaging. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 12, p. 2784–2791, 1 set. 2008.
- SCOTT-MCKEAN, J. J.; COSTA, A. C. S. Exaggerated NMDA mediated LTD in a mouse model of Down syndrome and pharmacological rescuing by memantine. **Learning & Memory**, v. 18, n. 12, p. 774–778, 1 dez. 2011.
- SHAHID, N. M. I.; LAW, E. L.-C.; VERDEZOTO, N. Technology-enhanced support for children with Down Syndrome: A systematic literature review. **International Journal of Child-Computer Interaction**, v. 31, p. 100340, 1 mar. 2022.
- SHALIN, S. C. et al. Neuronal MEK is important for normal fear conditioning in mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 75, n. 6, p. 760–770, 15 mar. 2004.
- SHERRIN, T.; BLANK, T.; TODOROVIC, C. c-Jun N-terminal kinases in memory and synaptic plasticity. **revneuro**, v. 22, n. 4, p. 403–410, 1 ago. 2011.
- SHOJI, H. et al. Contextual and Cued Fear Conditioning Test Using a Video Analyzing System in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 85, 1 mar. 2014.
- SILVA, J. C. S. et al. Regulação negativa de Calbindina-D28k durante o envelhecimento neural animal.

Revista Neurociências, v. 30, p. 1–36, 23 ago. 2022.

SMITH, K. S.; MORRELL, J. I. Comparison of infant and adult rats in exploratory activity, diurnal patterns, and responses to novel and anxiety-provoking environments. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 449–461, jun. 2007.

STADELMANN, C. et al. Activation of Caspase-3 in Single Neurons and Autophagic Granules of Granulovacuolar Degeneration in Alzheimer's Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 5, p. 1459–1466, nov. 1999.

STURMAN, O.; GERMAIN, P. L.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 443–452, 3 set. 2018.

TALLINO, S. et al. Temporal and brain region-specific elevations of soluble Amyloid- β 40-42 in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome and Alzheimer's disease. **Aging Cell**, v. 21, n. 4, p. e13590, 15 abr. 2022.

TANG, Y.-P. et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 63–69, 2 set. 1999.

VILARDELL, M. et al. Meta-analysis of heterogeneous Down Syndrome data reveals consistent genome-wide dosage effects related to neurological processes. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 229, 11 dez. 2011.

VOS, T. et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1204–1222, 17 out. 2020.

WEHNER, J. M.; RADCLIFFE, R. A. Cued and Contextual Fear Conditioning in Mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 8.5C.1-8.5C.14, 1 abr. 2004.

WHITE, A. N. et al. Parental perspectives on research for Down syndrome. **Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities**, v. 35, n. 1, p. 179–187, 12 jan. 2022.

WILLSEY, H. R. et al. Localized JNK signaling regulates organ size during development. **eLife**, v. 5, n. MARCH2016, 14 mar. 2016.

YAMADA, K. et al. Analyses of fear memory in Arc/Arg3.1-deficient mice: intact short-term memory and impaired long-term and remote memory. **World Journal of Neuroscience**, v. 01, n. 01, p. 1–8, 31 maio 2011.

ZAMAN, S.; FORTEA, J. The crucial history of Down syndrome. **The Lancet Neurology**, v. 21, n. 3, p. 222, 1 mar. 2022.

ZAROW, C. et al. Neuronal Loss Is Greater in the Locus Coeruleus Than Nucleus Basalis and Substantia Nigra in Alzheimer and Parkinson Diseases. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 3, p. 337, 1 mar. 2003.

ZHOU, X. et al. Memantine Improves Cognitive Function and Alters Hippocampal and Cortical Proteome in Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Experimental Neurobiology**, v. 28, n. 3, p. 390–403, 30 jun. 2019.

3 PARECER DO COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)-UNOESTE

Certificado

<https://www.unoeste.br/SGP/certificados/ver.asp?h=ca07585e41b3f4...>

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista
PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUAÇÃO

PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado **"EFEITOS DA MEMANTINA EM CAMUNDONGOS65DN, UM MODELO PARA SÍNDROME DE DOWN: REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE"**, cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 7421 e tendo como participante(s) **LUIZ WALDEMAR DE OLIVEIRA (discente)**, **JULIA ABRÃO MARQUES DE SOUZA (discente)**, **LAURA FRANCO RODRIGUES (discente)**, **MARCOS NATAL RUFINO (discente)**, **HERMANN BREMER NETO (orientador responsável)**, foi avaliado e **APR. COM RECOMENDAÇÃO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 26 de Agosto de 2023.



Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Docente Responsável pela CPDI

4 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA: ARTIGO 1 e 2

Nutrition Reviews

Instructions to Authors

1. [Scope and audience](#)
2. [Mission and history](#)
3. [Article types](#)
4. [Terms of consideration](#)
5. [Authorship and originality](#)
6. [Funding and sponsorship](#)
7. [Declaration of Interests](#)
8. [Manuscript preparation](#)
9. [Procedures](#)

Scope and audience

Nutrition Reviews is a highly cited, monthly, international, peer-reviewed journal that specializes in the publication of authoritative, innovative, and critical literature reviews that provide new insights on current and emerging topics in nutritional sciences, food sciences, clinical nutrition, community nutrition, and nutrition policy. Readers of *Nutrition Reviews* include nutrition scientists, biomedical researchers, clinical and dietetic practitioners, and advanced students of nutrition.

Articles selected for publication will be consistent with the journal's mission and should clearly outline both the biological and practical nutritional implications of a timely topic, so the reader obtains a clear understanding of both the topic's nature and its relevance. The journal does not publish primary research. Reviews and commentaries on current cutting-edge nutrition topics are eligible for consideration, provided they are prepared in accordance with established guidelines. Unsolicited submissions written in English are welcome from all countries from individual scientists and research teams.

Mission and history

Nutrition Reviews was founded in 1942 in response to a recognized need for expert analysis and synthesis of the vast amounts of nutrition science research being generated worldwide. Today, that need is greater still and *Nutrition Reviews* continues to serve it with the same goal in mind: To help nutrition scientists, scholars, practitioners, and policy makers stay abreast of significant developments in the field through concise reports prepared with objectivity and a critical focus.

Article types

Nutrition Reviews publishes five types of review articles in both the narrative and systematic review formats. Additionally, commentaries about recent nutrition issues and events along with letters to the editor are also published. All review articles must address a clearly defined research question that is articulated in an abstract; they must also follow recognized approaches to the literature selection, analysis, and conclusions, as outlined in accepted guidelines. It is recommended that authors consult existing literature on what constitutes

various types of reviews. *Nutrition Reviews* does not publish original research articles. Authors are required to identify the type of article that is being submitted according the following categories:

- *Scoping Reviews* provide an evaluation of the type and amount of research available on a topic, as well as potential knowledge gaps. These reviews should address the big picture of an issue to present new concepts and frameworks being proposed for the field of nutrition.
- *Narrative Reviews* provide critical reviews that explain and summarize the literature on a specific nutrition topic that adds new knowledge to the current literature. Manuscripts that describe a concept or a process (e.g., a biochemical pathway, nutrition mechanism, or methodology) are well suited to be submitted as a narrative review. Narrative reviews do not require any specific guidance for determining which papers are used for the reviews but need to provide a critical and balanced review of the topic. Nutritional topics for which there is a significant amount of data and peer reviewed publications should be addressed by systematic reviews.
- *Systematic Reviews* provide a comprehensive review on a specific topic that has not been addressed, or include new literature that either substantiates past findings or provides new insight for the nutrition field. Systematic reviews need to follow and describe a structured approach for identifying a comprehensive search of the literature, and should analyze the literature based on accepted methodology so the approach can be replicated and compared with past reviews. Systematic reviews can include papers that have used qualitative, quantitative, or mixed method approaches to study a nutrition topic. Systematic reviews should be conducted by a research team.
- *Meta-Analyses* provide a systematic review of the literature that quantitatively combines data to provide an overall evaluation that supports or refutes the probability of a cause-and-effect nutrition relationship. Meta-analyses are especially helpful to determine a nutrition-disease link or the potential impact of nutrition interventions.
- *Umbrella Reviews* evaluate exiting systematic reviews and meta-analyses. These reviews should summarize the similarities and differences in the methods and conclusions from past reviews to help readers better understand a topic for which there have not been consistent results between previous reviews.
- *Commentaries* provide a discussion on the importance of a current method, study, or group of studies in nutrition research presented in the context of the larger body of research on that topic.
- *Letters to the Editor* are welcome. Letters should address issues related to a recently published review in the *Nutrition Reviews*. Letters should add to the discourse regarding the article by highlighting factors that may have influenced the outcome of a review. Upon acceptance of a letter, authors of the published review will be provided the opportunity to respond to the issues raised in the letter.

Identification of Nutrition Topics

Papers will be published under the type of review that was conducted. Upon submission, authors need to provide 5-7 key words to identify the nutrition topic that is being addressed by the manuscript.

Terms of consideration

All manuscripts submitted to the journal must be original works of authorship that are not under simultaneous consideration elsewhere and do not infringe the intellectual property rights of any individual or organization. All previously published information, whether by the authors themselves or other individuals, groups, or entities, must be appropriately cited. The final version must have been read and approved by all of the individuals named as authors. The work must present novel information that differs substantially from that presented in works published by the authors previously. Authors should attest to these terms in their cover letter.

Authorship and originality

To qualify for authorship, individuals *must meet all of the following criteria*: 1) contributed significantly to the work's conception, design, data collection (as applicable), or data interpretation and analysis; 2) participated in the writing or critical revision of the article in a manner sufficient to establish ownership of the intellectual content; and 3) read and approved the version of the manuscript being submitted. All authors share responsibility for ensuring the manuscript complies with the journal's style requirements and terms of consideration. Any requests for changes to author names, or order of appearance, that are received post submission will need to be approved in writing by all authors.

Funding and sponsorship

All sources of funding for the article's research, preparation, and publication should be noted in the article's Acknowledgments section under the subheading "Funding" and be acknowledged in the cover letter. The full name of the funding agency should be provided and grant numbers should be supplied. If grants or other funding were given to specific authors, the relevant individuals should be identified by their initials in parentheses.

The role any sponsor played in the study design, data collection and analysis, manuscript preparation and revision, and publication decisions should be made clear in the Funding declaration in the Acknowledgments section. Authors should also indicate whether they received complete access to data pertaining to the publication that was owned by the sponsor.

CrossRef Funding Data Registry

In order to meet the CHORUS at Oxford University Press authors are required to name their funding sources, or state if there are none, during the submission process. For further information on this process or to find out more about CHORUS, [visit the CHORUS initiative](#).

Declaration of Interests

All authors are required to disclose relevant competing interests by noting them in the Acknowledgments section of the manuscript under the subheading "Declaration of Interest." Guidelines regarding what constitutes a competing interest are included in the [Declaration of Interest form](#). Completed Declaration of Interest forms for each author should be uploaded as supporting Information at the time of manuscript submission.

Manuscript preparation

Cover letter. The cover letter should address the following topics: description of the work and its novelty; authorship; and originality. The description of the work should clearly indicate what novel contribution the submitted article makes to the existing literature. A statement should indicate that all listed authors meet the

criteria for authorship (see *Authorship and Originality* entry above) and that no individual meeting these criteria has been omitted. Regarding originality, the following should be declared or, if untrue, explained: 1) the submitted article represents the original work of the authors; 2) the article is not currently under consideration elsewhere, nor has it been previously published in the same or substantially similar form; and 3) no copyright to any other work was breached in the manuscript's creation.

Manuscript format. Manuscripts should be prepared electronically using word-processing software, preferably Microsoft Word. Article pages should be formatted as double-spaced and left-justified text with 1-inch margins and 12-point type. Pages and lines must be numbered.

Length restrictions. Articles in any category must be formatted as indicated in the *Manuscript format* guidelines section and reviews may not exceed 50 double-spaced pages in length, including references and illustrative material. Each article should provide a focused, concise, and objective investigation of a clearly defined topic. Commentaries should be less than 2000 words and letters to the editors should be less than 500 words.

Supplemental information. The option to publish certain material as "Supplemental Information" in an online-only format is provided. Authors are encouraged to make use of this option to accommodate material that may be of interest to the reader but is not integral to the work itself. Examples would include extensive summary tables and appendices. It is particularly important that the main text of an article include everything essential for a complete understanding of the review and that the main text stands alone from the Supplemental Information. Readers should not need to toggle between documents to obtain or understand information. If references are included in Supporting information documents, they should be listed at the end of each document and appear in a numerical sequence pertaining solely to that document.

Cover page. The following information should be included on the cover page:

- *Article type.* Choose one of the article types in which the journal specializes. Editors may change this designation if they find the article is better suited to another category.
- *Title.* The title of the article should be short (200 characters or less), specific, and accurately describe the topic of the work. Abbreviations and acronyms should not be used unless they are widely recognized and generally understood, e.g. HIV, DNA. Articles and phrases such as "the use of," "the treatment of," and "a report of" should be avoided.
- *Author names.* Please list the first name, middle initial(s), last name and academic degrees of each author in descending order of their contributions to the article. Each author should provide an ORCID identification. Individuals who provided technical or administrative support should be recognized in the Acknowledgments section.
- *Author affiliations.* The names of all authors affiliated with a particular institution should be listed directly above the affiliation. Each affiliation should include the department, institution, city, state (spelled out, if applicable), and country.
- *Corresponding author.* The name, complete mailing address, telephone and e-mail address should be provided for the author responsible for correspondence.

- *Abstract.* All reviews need to include a formatted abstract. The length should not exceed 300 words. Abstracts exceeding these word limits will be shortened during copyediting. References, tables, and figures should not be cited in the abstract. Abstracts are to have the following sections:
 - Objectives that describes the primary reason for the review
 - Background that identifies the justification for the review
 - Methods of data sourcing and extraction and data synthesis (as applicable)
 - Results that summarizes the main findings
 - Conclusion that identifies the contribution the paper has made to the literature and recommendations as appropriate.
- *Key words.* At least three to five key words or phrases need to be provided.

Sections and headings

Scoping and Narrative Reviews

Each manuscript should contain at a minimum the following sections in addition to the abstract:

- Introduction that includes the justification and objectives for the review.
- Methods used to review the literature by describing how you identified what papers were used. There is no set format for this section.
- Discussion regarding the topic being reviewed.
- Conclusion (at the end of the text).
- Acknowledgements (after the Conclusion).
- Funding and sponsorship (as part of the Acknowledgments).
- Declaration of interest (as part of the Acknowledgments).
- References (after the Acknowledgments).
- List of any Supporting Information included (after the acknowledgements and before the reference list)
- Table Legend and Figure Legend listing the tables and figures included in the manuscript (after the reference list)

Between the Introduction and Conclusion, additional headings and subheadings are at the discretion of the author. Headings and subheadings should be used to organize the text and guide the reader.

Systematic reviews and Meta-Analyses

Articles of this type should be prepared in accordance with relevant, existing guidelines (e.g., PRISMA or MOOSE checklists) and be structured accordingly. If the guidelines used include a checklist, the completed checklist should be uploaded as Supporting Information during the manuscript submission process. Questions regarding the acceptability of chosen guidelines can be sent to the journal's editorial office via e-mail (nutritionreviews@ilsi.org). Each manuscript should contain at a minimum the following sections:

- A structured, concise abstract containing the following subheadings: Context, Objective, Data Sources, Data Extraction, Data Analysis, Conclusions.
- Introduction that includes a sufficient amount of background information to justify the review, and the objectives for the review including the question(s) being addressed by the review.

- Methods used to review and evaluate the literature using standardized procedures. This should include the databases used for the review, the key search terms, the criteria for excluding or including previous studies, and how the studies were evaluated and by whom. Finally, the methods should include how the data were analyzed including the statistical methods for any meta-analyses that were conducted.
- PICOS criteria (participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design) used to define the research question as Table 1 and cite the table at an appropriate place in the text.
- A flow chart of the literature search process.
- A completed MOOSE/PRISMA checklist as part of the Supporting Information.
- Results to report what previous papers were identified, reviewed and included in study (number and types of articles). An analysis should include the methods used to determine the quality of the studies. Key characteristics of the studies used for the review should be included within a table (e.g. study designs, characteristics of subjects, sample size, risk of bias and outcomes). Meta-analyses need to include the results of the statistical analyses and should illustrate the results using appropriate graphic presentations.
- Discussion that summarizes the main results of the review, compares the findings of the review to existing literature, and states limitations of the review. The discussion section also includes the author's interpretation of the results and their implications for policy, practice and future research.
- Conclusion that summarizes the impact of the review and provides recommendations for studies, policy, and practice as appropriate.
- Acknowledgements (after the Conclusion)
- Funding and sponsorship (as part of the Acknowledgments)
- Declaration of interest (as part of the Acknowledgments)
- References (after the Acknowledgments).
- List of any Supporting Information included (after the acknowledgements and before the reference list)
- Table Legend and Figure Legend listing the tables and figures included in the manuscript (after the reference list)

Umbrella

Articles of this type should be presented as a systematic review of previous reviews. Thus, the sections are the same as a systematic review. Each manuscript should contain at a minimum the following sections in addition to the abstract:

- A structured, concise abstract containing the following subheadings: Context, Objective, Data Sources, Data Extraction, Data Analysis, Conclusions.
- Introduction that includes a sufficient amount of background information to justify the review, and the objectives for the review including the question(s) being addressed by the review.
- Methods used to review and evaluate the literature using standardized procedures. This should include the databases used for the review, the key search terms, the criteria for excluding or including

previous studies, and how the studies were evaluated and by whom. Finally, the methods should include how the data were analyzed including the statistical methods for any meta-analyses that were conducted.

- PICOS criteria (participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design) used to define the research question as Table 1 and cite the table at an appropriate place in the text.
- A flow chart of the literature search process.
- A completed MOOSE/PRISMA checklist as part of the Supporting Information.
- Results to report what previous papers were identified, reviewed and included in study (number and types of articles). An analysis should include the methods used to determine the quality of the studies. Key characteristics of the studies used for the review should be included within a table (e.g. study designs, characteristics of subjects, sample size, risk of bias and outcomes). Meta-analyses need to include the results of the statistical analyses and should illustrate the results using appropriate graphic presentations.
- Discussion that summarizes the main results of the review, compares the findings of the review to existing literature, and states limitations of the review. The discussion section also includes the author's interpretation of the results and their implications for policy, practice and future research.
- Conclusion that summarizes the impact of the review and provides recommendations for studies, policy, and practice as appropriate.
- Acknowledgements (after the Conclusion)
- Funding and sponsorship (as part of the Acknowledgments)
- Declaration of interest (as part of the Acknowledgments)
- References (after the Acknowledgments).
- List of any Supporting Information included (after the acknowledgements and before the reference list)
- Table Legend and Figure Legend listing the tables and figures included in the manuscript (after the reference list)

Commentaries and Letters to the Editor

Commentaries and *Letters to the Editor* do not have a set format for submission. Submissions should use prose to convey their message. Tables and figures are not usually provided but may be acceptable and their applicability will be determined. References should be limited to less than 10 citations. Commentaries and Letters to the Editor must still include an abstract and key words.

Other Guidelines

Abbreviations and acronyms. Abbreviations and acronyms should not be used unless they are widely recognized and generally understood, e.g. BMI, FDA. These should only be used for terms used more than four times in the text. If that criterion is met, the term should be spelled out on first use followed by the abbreviation or acronym in parentheses. The abbreviated form should be used consistently thereafter, except in section headings, where it should continue to be spelled out.

References. The number of references cited should be tailored to the material being reviewed and be from reputable sources. As a general rule, should not include more than 200 references for reviews and not more than 10 references for commentaries and letters to the editor.

References should be numbered sequentially upon first appearance in text, tables, and figures. They should be typed as superscripts and placed after commas and periods but before colons and semicolons. When citing a series of consecutive numbers, provide the first and last with a dash between them (e.g., ^{5–7}). When referring to a group of authors in the text, the format “Smith et al.²³” should be used. Reference numbers should not be surrounded by brackets or parentheses.

References cited only in figure or table legends should be numbered according to the first mention of the graphic in the text and should be cited immediately after the first reference to the table or figure in the text. Reference to unpublished work or personal communications should be avoided but, when essential, should be identified in the text as “unpublished data” or “personal communication from ...”, not in the reference list. To ensure long-term accessibility, internet citations should only be used if that is the sole source of the information.

The reference list should be formatted according to AMA (American Medical Association) style. For each citation, sufficient information must be provided to allow a reader to know in what medium the material appeared and to access the information. Please list all authors if there are six or fewer; for seven or more authors, list the first three followed by “et al.” Examples of AMA style are as follows:

Journal article: Gordon KB, Papp KA, Hamilton TK, et al, for the Efalizumab Study Group. Efalizumab for patients with moderate to severe plaque psoriasis: a randomized controlled trial. JAMA. 2003;290:3073–3080.

Chapter in a book: Dybul M, Connors M, Fauci AS. Immunology of HIV infection. In: Paul WE, ed. Fundamental Immunology. 5th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2003:1285–1318.

Entire book: Gibson GR, Rastall RA. Prebiotics: Developments and Application. Hoboken, NJ: Wiley; 2006.

Government bulletin: Guidance on Labeling of Foods That Need Refrigeration by Consumers. College Park, MD: Office of Food Labeling, US Food and Drug Administration; 1997. Docket No. 96D-0513.

Internet citation: American College of Surgeons. National Trauma Data Bank Report 2006, Version 6.0. Chicago, USA. Available at: <http://www.facs.org/trauma/ntdb/ntdbannualreport2006.pdf>. Accessed on October 22, 2007.

More detailed guidance on Internet citations is provided in [the recommendations of the Library of Medicine](#).

Tables and illustrations

Tables and illustrations should be numbered in the sequence in which they appear in the text. They should appear in sequence after the reference list.

Tables. All tables should be included in the main manuscript file after the reference list. Each table should be constructed using the table functions of the word-processing program being used. Please avoid including Microsoft Excel files as tables. A title should appear at the top of each table. A column heading should appear in the top cell of each column. Within the table, each data set should appear in a single cell; the return key should not be used within any cell. Text should be justified to the left. Numerical data should be justified

to the decimal point. Capitalization should be restricted to the first letter of the legend, the first letter in each cell, and applicable abbreviations or acronyms. Abbreviations used in the table should be spelled out in a footnote. When citing prior studies in tables please use the following format: Smith et al. (1998)²¹.

Illustrations. All artwork should be submitted in digital format in separate files saved using the following convention: surname of first author_figure number (e.g., Smith_figure 1). Figure legends should be cited in the manuscript after the reference list but should not appear in the figures themselves. Charts and graphs downloaded from the Internet are not acceptable. Line artwork (vector graphics) should be saved in Encapsulated PostScript (EPS) format and bitmap files (halftones or photographic images) in Tagged Image Format (TIFF), with a resolution of at least 300 dpi at final size. Do not send native file formats. More detailed guidance for submitting electronic artwork can be found at [the Author Resource Centre](#). A free tool for converting files to other formats can be located at [the Zamar website](#). There is a soft maximum of 5 figures per manuscript.

Color illustrations. Artwork submitted in color is reproduced in color online at no cost. If color reproduction is desired in the print version of the journal, a contribution of US \$600 per figure is required.

Illustration permissions. If a table or figure is a reproduction or adaptation of a previously published work, written permission to reproduce or adapt the material must be obtained from the copyright holder prior to submission, and the source of the material must be cited either in a footnote to the table or in the figure legend. When requesting permission, rights to worldwide distribution in both print and electronic formats must be secured. *The permissions grant must be included with the original submission.* This requirement also applies to material published as Supporting Information.

If you will be publishing your paper under an Open Access license but it contains material for which you *do not* have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

Title of content

Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]

Language Editing. Language editing, if your first language is not English, to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers is optional. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. For further information on this service, please see the [Language Services page](#). Several specialist language editing companies offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.

Availability of Data and Materials

Where ethically feasible, *Nutrition Reviews* strongly encourages authors to make all data and software code on which the conclusions of the paper rely available to readers. We suggest that data be presented in the main manuscript or additional supporting files, or deposited in a public repository whenever possible. This includes the complete list of all papers identified for systematic reviews whether they are used or not used for evaluating the literature. For information on general repositories for all data types, and a list of recommended repositories by subject area, please see [Choosing where to archive your data](#).

Data Citation

Nutrition Reviews supports the [Force 11 Data Citation Principles](#) and requires that all publicly available datasets be fully referenced in the reference list with an accession number or unique identifier such as a digital object identifier (DOI). Data citations should include the minimum information recommended by [DataCite](#):

- [dataset]* Authors, Year, Title, Publisher (repository or archive name), Identifier

*The inclusion of the [dataset] tag at the beginning of the citation helps us to correctly identify and tag the citation. This tag will be removed from the citation published in the reference list.

Preprint Policy

Authors retain the right to make an Author's Original Version (preprint) available through various channels, and this does not prevent submission to the journal. For further information see our [Online Licensing, Copyright and Permissions policies](#). If accepted, the authors are required to update the status of any preprint, including your published paper's DOI, as described on our [Author Self-Archiving policy page](#).

Procedures

Manuscript processing

Manuscript submission. Manuscripts should be [submitted online](#). There is no charge for submission. [Full instructions](#) and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. Support can be contacted by phone (+1-434-817-2040) by e-mail (ts.mcsupport@thomson.com) or [online](#). If you cannot submit online, please contact the Editorial Office by e-mail (nutritionreviews@ilsi.org).

Use of iThenticate. *Nutrition Reviews* uses [iThenticate software](#) to determine the level of similarity between text in submitted articles and in articles published previously. Every manuscript received for consideration is run through this software directly following submission. Results are evaluated by the journal's editors and included in deliberations about the manuscript's suitability for publication.

Review process. Manuscripts are peer-reviewed promptly after submission, and are usually published within 10 months of acceptance. Authors may be asked to revise their manuscript to address any concerns raised during the review process. Authors may check the progress of their manuscript by logging in to the Manuscript Central site.

License to publish. Authors are required to complete an Author License form prior to publication of their work. The form will be provided to the corresponding author by the journal's production editor shortly after manuscript acceptance.

Copyediting and proofs. Manuscripts accepted for publication are edited for clarity of content, consistency, and style prior to publication. Following copyediting and typesetting, formatted proofs are sent to the authors via e-mail for final approval. Authors should check the proofs promptly and carefully to answer any queries posed by the copyeditor and to ensure the text is complete and that all tables and figures are included and properly cited. Complete instructions are sent out with the proofs.

Author Copies and Offprints. Following publication, a free link to the published version of the article is provided to the corresponding author for distribution to coauthors and interested colleagues. This link permits free access with full online functionality without the need for a subscription.

Ethics and misconduct

Nutrition Reviews is a member of the [Committee on Publication Ethics](#) and consults the guidelines of that organization as well as the [International Committee of Medical Journal Editors](#), and the [World Association of Medical Editors](#) when handling allegations of misconduct.

All authors are obliged to ensure their manuscripts reflect the highest standards of scientific and ethical integrity. Evidence of possible scientific or ethical misconduct related to manuscripts submitted for review or published in *Nutrition Reviews* will be investigated for the purpose of determining the appropriate editorial course of action.

Open access

Nutrition Reviews offers the option of publishing under either a standard licence or an open access licence. Please note that some funders require open access publication as a condition of funding. If you are unsure whether you are required to publish open access, please do clarify any such requirements with your funder or institution.

Should you wish to publish your article open access, you should select your choice of open access licence in our online system after your article has been accepted for publication. You will need to pay an open access charge to publish under an open access licence. Please note that there is no charge for publishing under a standard licence.

[Details of the open access licences and open access charges.](#)

OUP has a growing number of Read and Publish agreements with institutions and consortia which provide funding for open access publishing. This means authors from participating institutions can publish open access, and the institution may pay the charge. [Find out if your institution is participating.](#)

Post-production corrections

No correction to a paper already published will be carried out without an erratum or corrigendum (as applicable). This applies to papers on Advance Access and published within an issue. This means that any change carried out to a paper already published online will have a corresponding erratum or corrigendum published with its own separate DOI. Whether on Advance Access or in an issue, if an erratum or corrigendum is published, the online version of the original paper will also be corrected online and the correction notice will mention this. Corrections will only be made if the publication record is seriously affected by the academic accuracy of published information.

Authors' corrections to Supplementary Data are made only in exceptional circumstances (for example major errors that compromise the conclusion of the study). Because the Supplementary Data is part of the original paper and hence the published record, the information cannot be updated if new data have become available or interpretations have changed.

Compliance with funding bodies

Note to NIH Grantees. Pursuant to NIH mandate, the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders will be posted to PubMed Central on the author's behalf. Due to a processing delay, this posting could take up to several months. If you require deposit sooner, please email the production department at nutritionreviews@oup.com to request a manual deposit.