UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA

SUÉLEN SANTOS ALVES

***Wistar Audiogenic Rat (WAR): um possível modelo
para o estudo da doença de Alzheimer relacionada
com resistência à insulina***

Ribeirão Preto
2018

SUÉLEN SANTOS ALVES

***Wistar Audiogenic Rat (WAR): um possível modelo
para o estudo da doença de Alzheimer relacionada
com resistência à insulina***

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Neurologia – Opção: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Garcia-Cairasco.

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Suélen Santos

Wistar Audiogenic Rat (WAR): um possível modelo para o estudo da
doença de Alzheimer relacionada com resistência à insulina.
Ribeirão Preto, 2018.

114p.;30 cm

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e
Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Norberto Garcia-Cairasco

1. Wistar Audiogenic Rat. 2. Doença de Alzheimer. 3. Memória. 4.
Insulina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Suélen Santos Alves

Wistar Audiogenic Rat (WAR): um possível modelo para o estudo da doença de Alzheimer relacionada com resistência à insulina.

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Neurologia – **Opção:** Neurociências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Dedico essa dissertação aos meus pais Osvaldo Galdino Alves e Diva Aparecida dos Santos Alves, que batalharam incansavelmente para que eu pudesse chegar onde eles não conseguiram. Obrigada pelo apoio e incentivo. É por todo esse amor incondicional que dedico este trabalho a vocês.

Agradecimentos

A **Deus**, minha maior fonte de força espiritual. Obrigada pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência.

Aos meus queridos pais **Osvaldo e Diva** que sempre acreditaram no meu potencial e batalharam muito para que eu chegasse até aqui. Vocês sempre foram minha maior inspiração!

Aos meus irmãos **Lucas e Bianca** que sempre estiveram ao meu lado, em momentos bons e ruins, me apoiando e dando forças para seguir em frente. Obrigada por todos os conselhos e ensinamentos. Tenho muito orgulho de vocês!

Ao meu namorado **Christian Fressato**, sempre ouvinte e atento às minhas inquietações. Você tem sido meu suporte em momentos difíceis. Obrigada pelo amor, paciência e compreensão!

A todos meus amigos, especialmente **Michele Kuceki e Jamile Santos**, que, mesmo distantes fisicamente, têm me apoiado e contribuído para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela amizade sincera e verdadeira!

Ao meu orientador **Norberto Garcia-Cairasco**, por ter me acolhido e dado a oportunidade de fazer parte do LNNE, o laboratório mais feliz da USP. Obrigada por acreditar em mim e por aceitar compartilhar comigo um pouco do seu vasto conhecimento. Seu apoio tornou meu sonho possível. Seus ensinamentos têm me tornado uma excelente pessoa e profissional. Obrigada por toda dedicação, ética e profissionalismo!

Aos meus “padrinhos acadêmicos” **Rui Milton e Polianna Delfino**, por todo ensinamento, dedicação e paciência. Vocês me ajudaram a dar “meus primeiros passos” na ciência. Sempre serei grata pela atenção, compreensão e amizade.

Aos técnicos **José Antônio, Flavio Del Vecchio e Rubens Melo**. Obrigada pela amizade, pelas contribuições e pelo apoio durante essa jornada. Sem vocês, este trabalho não seria possível.

A todos os **membros e agregados do LNNE** que se tornaram minha família em Ribeirão Preto. Obrigada pelos ensinamentos, pela convivência diária e pela amizade que tornou essa jornada mais agradável. Obrigada por cada sorriso e por cada palavra carinhosa. Sou grata por todos os momentos com vocês.

À professora **Enilza Maria Espreadico** e a todos os membros do seu laboratório por todo o apoio técnico e científico.

Ao professor **Adriano Silva Sebollela** e a todos os membros do seu laboratório pelo suporte e contribuições científicas.

Ao professor **Sebastião de Sousa Almeida** e a todos os membros do seu laboratório, especialmente **Rodrigo Focosi Mazzei, Tania Regina Riul e Naiany Faustino**, pela atenção, paciência, ensinamentos e amizade. Sou muito grata por ter conhecido vocês!

À **Universidade de São Paulo** por ter me proporcionado uma formação sólida e um ambiente que gera conhecimento e permite o surgimento de novas ideias.

À **Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** pelo financiamento deste trabalho.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ”*

Arthur Schopenhauer

Apoio financeiro:

- **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** – Processo número 2017/21155-3.
- **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** – O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
- **Fundação de Assistência ao Ensino e Pesquisa (FAEPA)** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- **Pró-Reitoria de Pós-Graduação** da Universidade de São Paulo.
- **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) 465458/2014** – “Translacional em Medicina” - Processo FAPESP: 2014/50891-1/Processo CNPq: 465458/2014-9.

RESUMO

ALVES, Suélen Santos. ***Wistar Audiogenic Rat (WAR): um possível modelo para o estudo da doença de Alzheimer relacionada com resistência à insulina.*** 2018. Dissertação (Mestrado em Neurologia/Neurociências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A linhagem *Wistar Audiogenic Rat (WAR)*, um modelo genético de epilepsia, apresenta diversas comorbidades. Dados prévios demonstraram níveis cerebrais elevados de proteína tau fosforilada (pTau), uma das principais características anatomopatológicas da doença de Alzheimer (DA). Estudos recentes sugerem que a DA seja um terceiro tipo de diabetes. O objetivo deste estudo foi validar a linhagem *WAR* como um possível modelo para o estudo da DA relacionada com alterações na regulação da via de sinalização da insulina. Para isso, foram selecionados 63 animais machos adultos e envelhecidos (n=28 *Wistars*, 14 *Wistars Hannover* e 21 *WARs*). Os animais foram submetidos ao labirinto aquático de Morris (LAM). Após o LAM, foram eutanasiados e tiveram seus hipocampus dissecados. Avaliou-se a expressão de beta-amilóide (A β), tau, pTau (S396), receptor de insulina (IR), receptor de insulina -1 fosforilado em serina 312 (pIRS-1 S312) e glicogênio sintase quinase 3 alfa e beta (pGSK-3 α/β S21/9) fosforiladas pelo método de *Western blotting* nos hipocampus ventral (HV) e dorsal (HD) e/ou confirmados por imunoistoquímica. Os animais da linhagem *WAR* adultos e envelhecidos apresentaram maior latência para encontrar a plataforma de fuga durante o período de treinamento e maioria dos retestes no LAM. Os animais *WAR* adultos apresentaram diminuição da expressão de A β e IR no HV, aumento da expressão de pGSK-3 α/β (S21/9) no HD e aumento do número de células positivas para pIRS-1 (S312) no hipocampo. Os animais envelhecidos apresentaram aumento da expressão de pTau (S396) nos HV e HD, diminuição de A β e IR no HV e aumento da expressão de pGSK-3 α/β (S21/9) nos HV e HD. Apesar de os animais *WAR* terem sido selecionados geneticamente para estudar epilepsia, nossos achados sugerem a coexistência de alterações comportamentais e moleculares características de DA e resistência central à insulina, podendo se somar ao fenótipo inicialmente selecionado. Portanto, outros estudos moleculares e histológicos são necessários para melhor compreensão dos dados encontrados e para possível validação da linhagem *WAR* como um modelo para estudar a relação entre DA e resistência central à insulina.

Palavras-Chave: *Wistar Audiogenic Rat (WAR)*, Doença de Alzheimer (DA), Memória, Insulina.

ABSTRACT

ALVES, S. S. **Wistar Audiogenic Rat (WAR): a possible model for the study of Alzheimer's disease related to insulin resistance.** 2018. Dissertação (Mestrado em Neurologia/Neurociências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The Wistar Audiogenic Rat (WAR), a genetic model of epilepsy, presents many comorbidities. Previous data suggested elevated brain levels of phosphorylated tau (pTau), one of the the main hallmarks of Alzheimer's Disease (AD). Recent studies have hypothesized AD as the third type of diabetes. Therefore, the aim of this study was to validate the WAR strain as a model to study AD and correlate with alterations in the insulin signaling pathway regulation. To this end, we selected 63 male adult and aged animals (n=28 Wistars, 14 Wistars Hannover and 21 WARs). The animals were subjected to the Morris Water Maze (MWM) test. After the MWM, the rats were euthanized and their ventral (VH) and dorsal (DH) hippocampi were dissected for Western blot analysis in order to measure the expression levels of A β , tau, pTau (S396), insulin receptor (IR), alpha and beta phosphorylated glycogen synthase kinase 3 (pGSK-3 α/β Ser21/9), and phospho-insulin receptor substrate-1 (pIRS-1 S312) in the ventral (VH) and dorsal hippocampus (DH) by means of the Western blotting method. The results were confirmed by immunohistochemical analysis. Both adult and aged WARs showed longer latency to find the escape platform during the learning period and most retests of the MWM. The adult WARs presented lower A β and IR expression in the VH, higher pGSK-3 α/β (S21/9) expression in the DH, and higher levels of positive cells for pIRS-1 (S312) in the hippocampus. The aged WARs presented higher pTau (S396) expression in both VH and DH, lower A β and IR expression in the VH, higher pGSK-3 α/β (S21/9) expression in both VH and DH. Although the WAR animals were primarily selected to study epilepsy, our findings in this study suggest the coexistence of an AD-like phenotype and central insulin resistance in addition to the initially selected epilepsy phenotype. Therefore, other molecular and histological studies are needed to better understand our data and to validate the WAR strain as a model to study the relationship between AD and central insulin resistance.

Keywords: Wistar Audiogenic Rat (WAR), Alzheimer's Disease (AD), Memory, Insulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da clivagem de APP e liberação do peptídeo beta-amilóide (A β).....	20
Figura 2 – Esquema representativo dos mecanismos que correlacionam resistência à insulina e doença de Alzheimer	23
Figura 3 – Desenho experimental.....	34
Figura 4 – Desenho representativo do labirinto aquático de Morris.	35
Figura 5 – Modelo Esquemático do labirinto aquático de Morris (LAM).	36
Figura 6 – Representação cronológica do protocolo experimental.	39
Figura 7 – Latência dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM)	47
Figura 8 – Distância calculada dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM).....	48
Figura 9 – Velocidade dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM).	48
Figura 10 – Ocupação do quadrante alvo por animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante a Probe Trial.	50
Figura 11 – Distância calculada animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante a Probe Trial	51
Figura 12 – Velocidade de animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante a Probe Trial.	51
Figura 13 – Latência dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o primeiro reteste.	52
Figura 14 – Distância Calculada dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o primeiro reteste.	53
Figura 15 – Velocidade dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o primeiro reteste.....	53
Figura 16 – Latência dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o segundo reteste.	54

Figura 17 – Distância Calculada dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o segundo reteste.	55
Figura 18 – Velocidade dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o segundo reteste.....	55
Figura 19 – Latência dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o terceiro reteste.	56
Figura 20 – Distância Calculada dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o terceiro reteste.....	56
Figura 21 – Velocidade dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o terceiro reteste.	57
Figura 22 – Latência dos animais Wistar e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM).	58
Figura 23 – Distância Calculada dos animais Wistar e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM).	58
Figura 24 – Velocidade dos animais Wistar e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM)	59
Figura 25 – Ocupação do quadrante alvo por animais Wistar e WAR durante a Probe Trial.	60
Figura 26 – Distância Calculada de animais Wistar e WAR durante a Probe Trial.....	60
Figura 27 – Velocidade de animais Wistar e WAR durante a Probe Trial.....	60
Figura 28 – Latência de animais Wistar e WAR durante o primeiro reteste.....	61
Figura 29 – Distância Calculada de animais Wistar e WAR durante o primeiro reteste.	62
Figura 30 – Velocidade de animais Wistar e WAR durante o primeiro reteste.	62
Figura 31 – Latência de animais Wistar e WAR durante o segundo reteste.	63
Figura 32 – Distância calculada de animais Wistar e WAR durante o segundo reteste.....	63
Figura 33 – Velocidade de animais Wistar e WAR durante o segundo reteste.....	63
Figura 34 – Latência de animais Wistar e WAR durante o terceiro reteste.	64
Figura 35 – Distância Calculada de animais Wistar e WAR durante o terceiro reteste	65
Figura 36 – Velocidade de animais Wistar e WAR durante o terceiro reteste.....	65

Figura 37 – Quantificação da expressão e níveis de fosforilação (S396) da proteína tau em animais WAR adultos.....	67
Figura 38 – Quantificação da expressão e níveis de fosforilação (S396) da proteína tau em animais WAR envelhecidos	69
Figura 39 – Imagens representativas da imunomarcção de tau fosforilada (pTau) em hipocampo de ratos envelhecidos	71
Figura 40 – Quantificação do peptídeo beta-amilóide (A β) em ratos WAR adultos	72
Figura 41 – Quantificação do peptídeo beta-amilóide (A β) em ratos WAR envelhecidos.	73
Figura 42 – Imagens representativas da imunomarcção de beta-amilóide (A β) em hipocampo de ratos envelhecidos.....	74
Figura 43 – Quantificação da subunidade β do receptor de insulina (IR) em ratos WAR adultos.	75
Figura 44 – Quantificação da subunidade β do receptor de insulina (IR) em ratos WAR envelhecidos	76
Figura 45 – Imagens representativas da imunomarcção da subunidade β do receptor de insulina (IR) em ratos WAR envelhecidos	77
Figura 46 – Quantificação do número de células positivas para o substrato do receptor de insulina 1 fosforilado em serina 312 (pIRS-1 S312) por imunohistoquímica (DAB) em animais WAR adultos	78
Figura 47 – Imagens representativas da análise qualitativa da expressão do substrato do receptor de insulina 1 fosforilado pIRS-1 (312) por imunofluorescência.....	80
Figura 48 – Quantificação da Glicogênio Sintase Quinase 3 alfa e beta fosforiladas (pGSK-3 α/β) em ratos WAR adultos	81
Figura 49 – Quantificação da Glicogênio Sintase Quinase 3 alfa e beta fosforiladas (pGSK-3 α/β) em ratos WAR envelhecidos.....	82
Figura 50 – Detecção de A β -42 humano sintético (Anaspec 20276-1) em extratos de hipocampo de ratos WAR (3 meses)	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência padrão de tentativas e pontos de largada durante as sessões experimentais do Labirinto Aquático de Morris (LAM).....	37
Tabela 2 – Comparações entre animais <i>Wistar</i> , <i>Wistar Hannover</i> e <i>WAR</i> adultos (4 meses de idade) durante o período de treinamento (24 tentativas)	49
Tabela 3 – Comparações entre animais <i>Wistar</i> e <i>Wistar Hannover</i> adultos (4 meses de idade).....	49
Tabela 4 – Comparações entre animais <i>Wistar</i> e <i>WAR</i> adultos (4 meses de idade).....	50
Tabela 5 – Comparações entre animais <i>Wistar</i> , <i>Wistar Hannover</i> e <i>WAR</i> adultos (4 meses de idade) durante a <i>Probe Trial</i> (25 ^a tentativa).....	52
Tabela 6 – Comparações entre animais <i>Wistar</i> , <i>Wistar Hannover</i> e <i>WAR</i> adultos (4 meses de idade) durante o primeiro reteste (26 ^a tentativa).....	54
Tabela 7 – Comparações entre animais <i>Wistar</i> , <i>Wistar Hannover</i> e <i>WAR</i> adultos (4 meses de idade) durante o segundo reteste (27 ^a tentativa).....	55
Tabela 8 – Comparações entre animais <i>Wistar</i> , <i>Wistar Hannover</i> e <i>WAR</i> adultos (4 meses de idade) durante o terceiro reteste (28 ^a tentativa).....	57
Tabela 9 – Comparação entre animais <i>Wistar</i> , e <i>WAR</i> envelhecidos (17 meses de idade) durante o período de treinamento (24 tentativas)	59
Tabela 10 – Comparação entre animais <i>Wistar</i> , e <i>WAR</i> envelhecidos (17 meses de idade) durante a <i>Probe Trial</i> (25 ^a tentativa).....	61
Tabela 11 – Comparação entre animais <i>Wistar</i> e <i>WAR</i> envelhecidos (17 meses de idade) durante o primeiro reteste (26 ^a tentativa).....	62
Tabela 12 – Comparação entre animais <i>Wistar</i> e <i>WAR</i> envelhecidos (17 meses de idade) durante o segundo reteste (27 ^a tentativa).....	64
Tabela 13 – Comparação entre animais <i>Wistar</i> , e <i>WAR</i> envelhecidos (17 meses de idade) durante o terceiro reteste (28 ^a tentativa).....	65
Tabela 14 – Quantificação dos níveis da proteína Tau fosforilada (pTau), total (Tau) e relação pTau/tau por densitometria em extratos de hipocampo ventral (HV) e hipocampo dorsal (HD) de ratos adultos (4 meses).....	68
Tabela 15 – Quantificação dos níveis da proteína Tau fosforilada (pTau), total (Tau) e relação pTau/Tau por densitometria em extratos de hipocampo ventral (HV) e hipocampo dorsal (HD) de ratos envelhecidos (17 meses).....	70

Tabela 16 – Quantificação dos níveis do peptídeo beta-amilóide (A β) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos adultos (4 meses).....	73
Tabela 17 – Quantificação dos níveis do peptídeo beta-amilóide (A β) por densitometria em extratos de hipocampo ventral (HV) e hipocampo dorsal (HD) de ratos envelhecidos (17 meses).....	74
Tabela 18 – Quantificação da expressão do receptor de insulina (IR) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos adultos (4 meses)	76
Tabela 19 – Quantificação da expressão do receptor de insulina (IR) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos envelhecidos (14 meses)	77
Tabela 20 – Quantificação de células positivas para pIRS-1 S312 por imunistoquímica (DAB) em cortes congelados de hipocampo (40 μ m) de ratos <i>Wistar</i> e <i>WAR</i> adultos (4 meses).....	79
Tabela 21 – Quantificação da expressão da glicogênio sintase quinase 3 fosforilada α e β (pGSK-3 α/β S21/9) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos adultos (4 meses).....	82
Tabela 22 – Quantificação da expressão da Glicogênio Sintase Quinase 3 fosforilada α e β (pGSK-3 α/β) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos envelhecidos (17 meses).....	83

LISTA DE SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AGEs	Produtos finais da glicação avançada
APP	Proteína precursora de amilóide
A β	Peptídeo beta-amilóide
A β 40	Peptídeo beta-amilóide constituído por 40 aminoácidos
A β 42	Peptídeo beta-amilóide constituído por 42 aminoácidos
A β O	Oligômero de beta-amilóide
DA	Doença de Alzheimer
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GSK-3	Glicogênio Sintase Quinase 3
GSK-3 α	Glicogênio Sintase Quinase 3 alfa
GSK3- β	Glicogênio Sintase Quinase 3 beta
HD	Hipocampo dorsal
HV	Hipocampo ventral
IDE	Enzima degradadora de insulina
IGF	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
LAM	Labirinto Aquático de Morris
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
pTau	Tau fosforilada
Q1	Quadrante 1
Q2	Quadrante 2
Q3	Quadrante 3
Q4	Quadrante 4
SNC	Sistema Nervoso Central
TLE	Epilepsia do lobo temporal
WAR	Wistar Audiogenic Rat

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	18
1.2. A RELAÇÃO ENTRE DOENÇA DE ALZHEIMER E <i>DIABETES MELLITUS</i>	22
1.3. <i>WISTAR AUDIOGENIC RAT (WAR)</i>	28
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. OBJETIVO GERAL.....	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. ABORDAGENS EXPERIMENTAIS	33
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	34
3.3. TESTE PARA VERIFICAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL.....	35
3.4. WESTERN BLOTTING.....	39
3.5. ENSAIOS DE IMUNOISTOQUÍMICA	42
3.6. INJEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OLIGÔMEROS DE AB (ABOs)	45
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS.....	47
4.1. LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (LAM)	47
4.1.1. LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – GRUPO ADULTO.....	47
4.1.2. LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – GRUPO ENVELHECIDO	57
4.2. ANÁLISE DOS BIOMARCADORES DA DOENÇA DE ALZHEIMER	66
4.2.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TAU FOSFORILADA (PTAU) EM ANIMAIS <i>WAR</i> ...66	
4.2.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE EM RATOS <i>WAR</i>	72
4.3. ANÁLISE DA REGULAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA.....	75
4.3.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE INSULINA (IR) EM ANIMAIS <i>WAR</i>	75
4.3.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO SUBSTRATO DO RECEPTOR DE INSULINA-1 FOSFORILADO (S312) EM ANIMAIS <i>WAR</i>	78
4.3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA GLICOGÊNIO SINTASE QUINASE 3 ALFA E BETA FOSFORILADAS EM ANIMAIS <i>WAR</i>	81
5. DISCUSSÃO.....	84
6. CONCLUSÃO	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer no início do século XX. Alzheimer identificou no cérebro de Auguste Deter, uma paciente de 51 anos que apresentava sinais inequívocos de demência com perda rápida e progressiva da memória, características histopatológicas denominadas como placas e emaranhados neurofibrilares. Atualmente, esses achados são considerados os principais marcadores da DA (ALZHEIMER, 1907; STELZMANN; NORMAN SCHNITZLEIN; REED MURTAGH, 1995).

A demência é uma desordem neurológica altamente prevalente, acometendo mais de 46 milhões de pessoas no mundo. Entre as várias causas conhecidas, a DA corresponde a cerca de 60% a 80% dos casos, sendo o tipo de demência mais frequente e considerada um grave problema de saúde pública (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2016; ALZHEIMER ASSOCIATION, 2018). Selkoe e Hardy (2016) acreditam que esses números sejam ainda maiores, pois a doença pode ter início duas ou três décadas antes do aparecimento dos primeiros sintomas cognitivos. No Brasil, a incidência de DA na população com mais de 65 anos é de aproximadamente 7,9%, ou seja, 55 mil novos casos por ano (BURLÁ *et al.*, 2013).

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada principalmente por problemas cognitivos, tais como: perda de memória, alterações de linguagem e desorientação mental. Indivíduos com DA também podem apresentar sintomas não cognitivos, tais como agressividade, agitação, alucinação, ansiedade e depressão (REISBERG *et al.*, 1987). Além do aumento nas taxas de morte neuronal, os principais achados anatomopatológicos consistem na formação de placas senis, causadas pelo acúmulo de fragmentos do peptídeo beta-amilóide

(*amyloid beta*-A β) e emaranhados neurofibrilares, resultantes da hiperfosforilação da proteína tau (tau) (ALZHEIMER ASSOCIATION, 2018).

O peptídeo A β é derivado da proteína precursora de amilóide (*amyloid precursor protein*-APP). A APP e seus fragmentos podem apresentar funções importantes na atividade sináptica e no processo de aprendizado e memória (TURNER *et al.*, 2003; PUZZO *et al.*, 2011). Embora a função dessa proteína ainda não tenha sido totalmente esclarecida, o processo enzimático responsável pelo seu metabolismo e liberação de A β já é bem elucidado.

Diferentes enzimas podem mediar clivagens na APP, resultando na liberação de diferentes peptídeos. Na via mais comum, conhecida como não-amiloidogênica, a clivagem é mediada pela alfa-secretase, e ocorre na transição das porções intramembrana e extracelular, não havendo liberação do fragmento A β . Já na via amiloidogênica, a primeira clivagem da APP é mediada pela proteína beta-secretase, resultando no fragmento C-terminal C99 (Figura 1). Posteriormente, a enzima gama-secretase medeia a segunda clivagem, gerando o peptídeo A β (SELKOE, 2001). O acúmulo de A β pode ser responsável pelo início da formação de agregados neurofibrilares e aumento da morte neuronal observada na DA (SELKOE; HARDY, 2016).

Hardy e Higgins (1992) propuseram a hipótese da “cascata amiloide”. De acordo com essa proposta, a deposição do peptídeo A β em placas no SNC (sistema nervoso central) é o agente causador da patologia da DA e promove a formação de emaranhados neurofibrilares, morte celular, alterações vasculares e, conseqüentemente, demência. O fato de indivíduos com a síndrome de Down apresentarem sintomas precoces de DA, devido à trissomia no cromossomo 21, onde se localiza o gene da APP, corrobora essa hipótese (RUMBLE *et al.*, 1989; HANDEN *et al.*, 2012).

Figura 1 – Esquema representativo da clivagem de APP e liberação do peptídeo beta-amiloide (A β). O peptídeo beta-amiloide (A β) é derivado da proteína precursora de amiloide (APP). A APP sofre clivagem, mediada por diferentes enzimas, resultando na liberação de diferentes polipeptídeos. A clivagem mais comum ocorre na via denominada não-amiloidogênica. Nessa via, a APP é clivada pela alfa-secretase na transição dos segmentos intramembrana e extracelular, cindindo, portanto, o fragmento beta-amiloide ao meio e liberando o componente extracelular denominado APPs ou APP secretado. Por outro lado, na via amiloidogênica a clivagem é realizada primeiramente pela enzima beta-secretase, gerando o fragmento C-terminal C99. Posteriormente, esse fragmento é clivado pela gama-secretase, resultando na liberação do peptídeo beta-amiloide no meio extracelular. O peptídeo A β se agrega, formando oligômeros de A β que se depositam em placas (placas senis). (Adaptado de SPIES *et al.*, 2012).

Os peptídeos A β s podem ser encontrados em conformações fisiológicas diversas. As mais abundantes, no cérebro, são as constituídas por 40 (A β 40) e 42 (A β 42) aminoácidos. A A β 42 é descrita como a forma mais neurotóxica e apresenta maior tendência a oligomerização (MURPHY; LEVINE III, 2010). Neste sentido, os oligômeros assumem um vasto grupo de agregados não-fibrilares e são os constituintes de maior citotoxicidade neuronal (FALCO *et al.*, 2016). No SNC, os oligômeros de A β (*amyloid beta oligomers*- A β Os) podem influenciar negativamente nas funções sinápticas, levando a um progressivo quadro de déficit cognitivo (LAMBERT, *et al.*, 1998; MA; KLANN, 2012). A primeira observação de placas amilóides no

cérebro humano foi curiosamente descrita por Blocq Marinesco em 1892, em pacientes com epilepsia, 15 anos antes do primeiro relato de DA pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer (ALZHEIMER, 1907; HORVÁTH *et al.*, 2016).

Outra importante proteína envolvida na DA é a tau, principal proteína do grupo de proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) em neurônios. A tau interage com tubulina para promover estabilidade e dinâmica dos microtúbulos (WEINGARTEN *et al.*, 1975) um dos principais componentes do citoesqueleto. As funções da proteína tau são reguladas pelo seu grau de fosforilação (LINDWALL; COLE, 1984). Quando hiperfosforilada, a tau perde sua capacidade de interação com os microtúbulos afetando a sua estabilidade (ALONSO *et al.*, 2006). Na DA, todas as 6 isoformas da proteína tau podem se apresentar anormalmente hiperfosforiladas, resultando na formação de emaranhados neurofibrilares e desestabilização da rede de microtúbulos (GRUNDKE-IQBAL *et al.*, 1986).

De acordo com Braak e colaboradores (2006), em humanos a formação de emaranhados neurofibrilares geralmente tem início no córtex entorrinal, se espalhando posteriormente pelo hipocampo, neocórtex e lobo occipital. Diferentemente do que é observado para as placas senis, o número de emaranhados neurofibrilares parece estar diretamente relacionado com a gravidade da demência em indivíduos com DA (ARRIAGADA *et al.*, 1992).

A etiologia da DA é complexa e multifatorial. Os indivíduos acometidos por esse tipo de demência podem apresentar diversas comorbidades associadas. Estudos recentes têm investigado a influência de diferentes condições médicas na DA. Entre essas comorbidades, a *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), uma das principais condições crônicas que afetam a humanidade, parece ter um relevante papel importante no prognóstico da DA (KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2016; ARNOLD *et al.*, 2018).

1.2. A relação entre Doença de Alzheimer e Diabetes Mellitus

Estima-se que aproximadamente 451 milhões de pessoas vivam com diabetes no mundo. É esperado que esse número aumente para 693 milhões até 2045 (CHO *et al.*, 2018). A maioria dos casos apresenta DMT2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A DMT2 é considerada um fator de risco para a DA e outras demências, pois está relacionada com um declínio precoce da função cognitiva. Miles e Root (1922) foram os primeiros a demonstrar que indivíduos com diabetes apresentam pior desempenho em testes de atenção e memória. Yang e colaboradores (2013) e Baglietto-Vargas e colaboradores (2016) relatam que pacientes diabéticos apresentam risco significativamente maior de desenvolverem DA (50% - 100%), quando comparados a indivíduos não diabéticos. Sendo assim, sugere-se que a atual epidemia de DMT2 resulte em uma epidemia debilitante de demência no futuro (SUTHERLAND *et al.*, 2017).

A DMT2 é um distúrbio metabólico crônico caracterizado pela diminuição da secreção de insulina, resistência à insulina e hiperglicemia (VERDILE; FULLER; MARTINS, 2015). Entre as alterações moleculares encontradas no processo de resistência à insulina, que vem sendo relacionadas ao prognóstico da DA, estão a hiperfosforilação da proteína tau, o acúmulo de A β e a redução da atividade da quinase Akt/PKB, com consequente aumento da atividade do Glicogênio Sintase Quinase 3 (*Glycogen synthase kinase 3*- GSK-3). O aumento da ativação da GSK-3 pode estar envolvido não só na DMT2, mas também na DA (PARDESHI *et al.*, 2017). A GSK-3 apresenta duas isoformas: a alfa e a beta. Enquanto a isoforma alfa (GSK-3 α) apresenta papel importante na produção de A β (PHIEL *et al.*, 2003), a isoforma beta (GSK-3 β) modula a hiperfosforilação da proteína tau (HOOPER; KILLICK; LOVESTONE, 2008), (Figura 2).

Figura 2 – Esquema representativo dos mecanismos que correlacionam resistência à insulina e doença de Alzheimer. A insulina se liga à subunidade alfa do receptor de insulina (IR) induzindo autofosforilação em resíduos de tirosina da sua subunidade beta. As subunidades beta transduzem o sinal fosforilando os substratos do receptor de insulina (IRS) também em resíduos de tirosina. Após fosforilação em tirosina, os IRSs ativam a via de sinalização da Akt. A Akt, por sua vez, é responsável pela regulação da glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3). A GSK-3 apresenta duas isoformas: a alfa e a beta. Enquanto a isoforma alfa (GSK-3 α) apresenta papel importante na produção de A β , a isoforma beta (GSK-3 β) modula a hiperfosforilação da proteína tau. (Adaptado de YARCHOAN; ARNOLD, 2014).

A primeira descrição do envolvimento do sistema neuroendócrino na DA ocorreu há mais de três décadas (BUCHT *et al.*, 1983). Atualmente, estudos neuropatológicos têm demonstrado que indivíduos diabéticos, sem sinais clínicos de demência, podem apresentar atrofia cerebral (MORAN *et al.*, 2017), infartos cerebrais subclínicos e outros achados que são similares aos encontrados na DA (TESSIER; MENEILLY; 2015). A diabetes também vem sendo relacionada com outras doenças neurodegenerativas como a Doença de Huntington, a Síndrome de Werner e a Ataxia de Friedreich (SATO *et al.*, 2006).

Diferentes estudos demonstraram que as deficiências na resposta à insulina podem estar entre os principais mecanismos que contribuem para o quadro clínico desses distúrbios

encontrados no sistema nervoso central (SCHULINGKAMP *et al.*, 2000). Devido à significativa alteração na regulação da via de sinalização da insulina no cérebro dos pacientes acometidos por esse tipo de demência, a DA têm sido considerada por muitos autores um terceiro tipo de diabetes (COLE *et al.*, 2007; AKTER *et al.*, 2011; KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2016; LESZEK *et al.*, 2017; PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2017; DE LA MONTE; TONG; WANDS, 2018; ARNOLD *et al.*, 2018).

A insulina, um hormônio polipeptídico anabólico de baixo peso molecular, é geralmente secretado pelo pâncreas, especificamente pelas células beta pancreáticas em resposta ao aumento nos níveis de glicose na corrente sanguínea. Embora a captação de glicose por neurônios do SNC não seja dependente de insulina, a presença de receptores de insulina (*insulin receptor-IR*) no SNC, especialmente no hipocampo e no córtex temporal em geral, demonstra que esse hormônio possui funções importantes no cérebro, possivelmente relacionadas à memória (CRAFT, 2009). A insulina medeia uma complexa cascata de sinalização celular que ativa diversas vias, como proliferação, sobrevivência, apoptose, senescência e reparo celular (AKTER *et al.*, 2011). Tanto a insulina quanto os fatores de crescimento semelhantes à insulina (*insulin-like growth factor* -IGF) são capazes de ativar essa cascata.

Apesar dos mecanismos de síntese de insulina no SNC ainda não serem completamente compreendidos, estudos indicam que a insulina sistêmica pode ser transportada ativamente através da barreira hematoencefálica (PARDRIDGE; EISENBERG; YANG, 1985; SCHWARTZ *et al.*, 1991; BAURA *et al.*, 1993; BANKS *et al.*, 1997), ou produzida localmente no cérebro (GIDDINGS; CHIRGWIN; PERMUTT, 1985; CLARKE *et al.*, 1986; YOUNG, 1986; SCHECHTER, 1992; DEVASKAR, 1994; BLÁZQUEZ *et al.*, 2014). A síntese de insulina no SNC foi demonstrada em diferentes estruturas, como o hipocampo e bulbo olfatório, sugerindo que a insulina possa apresentar funções relacionadas a memória e comportamento

alimentar (DEVASKAR *et al.*, 1994). Além disso, a síntese de insulina foi observada em neurônios, e as células da glia não parecem participar neste processo.

A insulina ativa diretamente os IRs, que são altamente expressos em neurônios e células da glia, especialmente no córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo, cerebelo e bulbo olfatório (MARKS *et al.*, 1990). Em neurônios, os IRs estão geralmente localizados nas membranas sinápticas, onde regulam o recrutamento e liberação de neurotransmissores, modulando a atividade neuronal. A insulina e os IGFs parecem estar envolvidos na plasticidade sináptica e na cognição (KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2016). Portanto, eventos que resultam em comprometimento desses receptores ou sua localização no SNC podem levar a danos cognitivos progressivos.

Na DA, os A β Os podem resultar em resistência à insulina através de ligações de A β a superfície da membrana neuronal. Essa ligação é capaz de remover os IRs da área sináptica e, conseqüentemente, promover perda de sinapses (KAMINARI *et al.*, 2017). Por outro lado, o tratamento com insulina pode aumentar o desempenho da memória em modelos animais e humanos, promovendo efeitos positivos na cognição (GASPARINI *et al.*, 2002).

O IR é composto por dímeros das subunidades alfa (extracelular) e subunidades beta (intracelular) unidos por pontes dissulfeto. A insulina ou os IGFs se ligam às subunidades alfa do IR induzindo autofosforilação em resíduos de tirosina da sua subunidade beta, promovendo assim, a ativação de diversas vias de sinalização (WILDEN *et al.*, 1992). Quando fosforiladas, as subunidades beta transduzem o sinal, fosforilando outros substratos, como os chamados substratos do receptor de insulina (*insulin receptor substrate-IRS*) (PLUM; SCHUBERT; BRÜNING, 2005).

Os IRSs possuem ainda funções relacionadas ao crescimento e controle glicêmico, e podem apresentar-se alterados em condições de resistência à insulina (CARVALHEIRA;

ZECCHIN; SAAD, 2002). Os membros IRS-1 e o IRS-2 são os principais e mais bem descritos em humanos (LAVIN; WHITE; BRAZIL, 2016). O IRS-1 apresenta funções essenciais no tecido adiposo, músculo esquelético e córtex cerebral (ARNOLD *et al.*, 2018) e sua deficiência pode resultar em retardo no crescimento, hiperplasia das células beta pancreáticas e comprometimento metabólico considerável, em modelos animais (ARAKI *et al.*, 1994). Por outro lado, o IRS-2 apresenta funções importantes no fígado e hipotálamo e animais com deficiências desse substrato adquirem diabetes devido à insuficiência das células beta pancreáticas, resistência periférica e resistência hepática à insulina (WITHERS *et al.*, 1998). A presença de IRSs pode estar diminuída em pacientes com DA, resultando em hiperfosforilação da proteína tau. Essa diminuição já foi identificada em neurônios do córtex temporal (LAVIN; WHITE; BRAZIL, 2016) e especificamente do hipocampo (TALBOT *et al.*, 2012) de cérebros *post-mortem* de pacientes com DA.

Após a fosforilação em tirosina, os IRSs promovem os efeitos neurotróficos da insulina através da ativação da via de sinalização da Akt. Essa complexa cascata de sinalização ativada pela insulina é responsável pela regulação de diversas proteínas intracelulares importantes, como a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*- mTOR) e a quinase GSK-3. Comprometimentos no processamento ou modulação da insulina no SNC podem provocar uma redução da atividade da Akt, aumentando a atividade da GSK-3 α e β , e, conseqüentemente, contribuindo para a produção de A β 40 e A β 42 (PHIEL *et al.*, 2003) e para a formação de emaranhados neurofibrilares através da hiperfosforilação da proteína tau (BHAT; BUDD HAEBERLEIN; AVILA, 2004).

A fosforilação de IRS-1 é um dos eventos mais importantes na via de sinalização da insulina. Enquanto sua fosforilação em tirosina promove a ativação de Akt e mTOR e inibição de GSK-3, a fosforilação anormal de IRS-1 em serinas, pode resultar em inibição de sua

atividade e, conseqüentemente, em resistência à insulina (QIAO *et al.*, 1999; HIROSUMI *et al.*, 2002). Estudos já demonstraram níveis elevados de fosforilação anormal em serinas de IRS-1 em hipocampus de pacientes e modelos animais com DA (BOMFIM *et al.*, 2012; TALBOT *et al.*, 2012).

A enzima degradadora de insulina (*insulin degrading enzyme*- IDE) é uma das principais responsáveis pela degradação de A β (MURPHY; LEVINE III, 2010). Entretanto, dada sua maior afinidade, a IDE se liga preferencialmente a insulina, quando comparada com outros substratos, incluindo A β . Sendo assim, a insulina ou fatores que afetam seus níveis, como é o caso da DMT2, podem modular, ainda que indiretamente, os níveis de A β circulante. É possível que altos níveis de insulina no cérebro resultem no maior acúmulo de A β 42 e deposição gradual em placas senis (QIU; FOLSTEIN, 2006; TOWNSEND *et al.*, 2012; HAQUE; NAZIR, 2014). Além disso, na DA, o peptídeo A β pode formar oligômeros que se ligam a determinados receptores celulares, atuando em certas condições como antagonistas da insulina, restringindo a ativação da Akt e aumentando a ativação da GSK-3 α e β (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

Mediante o exposto, os modelos experimentais são fundamentais para a investigação e compreensão da fisiopatologia da DA e possibilitam testes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Atualmente, os modelos mais utilizados são camundongos transgênicos que expressam genes humanos que resultam na formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares. Embora diversos testes pré-clínicos utilizando modelos transgênicos tenham sido considerados bem-sucedidos, a taxa de falhas em ensaios clínicos é de aproximadamente 99,6%, levando a questionamentos sobre a validade desses modelos (CUMMINGS; JEFFREY; MORSTORF; ZHONG, 2014; BANIK *et al.*, 2015). Além disso, modelos transgênicos expressam mutações gênicas específicas, mimetizando apenas os casos de DA familiar ou de início precoce, que correspondem a menos de 5% dos casos presentes na DA. A DA esporádica

ou de início tardio corresponde a aproximadamente 95% dos casos e sua fisiopatologia não pode ser representada adequadamente por animais transgênicos (DRUMMOND; WISNIEWSKI, 2017), justificando assim, o uso de modelos que possam representar condições clínicas reais.

1.3. *Wistar Audiogenic Rat (WAR)*

Com o objetivo de estabelecer um modelo animal, geneticamente susceptível a crises epiléticas, Garcia-Cairasco e colaboradores (1990) desenvolveram através de uma série de cruzamentos endogâmicos entre animais da linhagem *Wistar*, a linhagem *Wistar Audiogenic Rat (WAR)* (DORETTO *et al.*, 2003). Animais da linhagem *WAR* apresentam crises tônico-clônicas generalizadas, quando estimulados acusticamente (120 dB) em protocolo agudo e crises límbicas, quando estimulados cronicamente (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996; MORAES *et al.*, 2000).

A linhagem *WAR* é um importante modelo para o estudo das epilepsias e suas comorbidades associadas vem sendo o foco de inúmeros trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (GARCIA-CAIRASCO; UMEOKA; DE OLIVEIRA, 2017). As crises audiogênicas são caracterizadas por um período inicial de corrida selvagem, pulos e queda atônica, seguido por crises tônico-clônicas, terminando com apneia e depressão pós-ictal (REID *et al.*, 1996; DORETTO *et al.*, 2003; ROSSETTI *et al.*, 2012). Essas crises podem ainda ser facilmente identificadas e graduadas em escala de gravidade, o que favorece sua utilização para a análise de intervenções que possam influenciar neste fenótipo (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996; ROSSETTI *et al.*, 2006).

Análises comportamentais e registros eletrencefalográficos (EEG) têm demonstrado que a linhagem *WAR* apresenta crises audiogênicas com baixa latência, alta severidade e atividade epileptiforme clara (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996; MORAES *et al.*, 2000; ROMCY-

PEREIRA; GARCIA-CAIRASCO, 2003). Entretanto, diferente do descrito em outros modelos de epilepsia, sobre tudo aqueles com eventos epileptiformes mais duradouros como o denominado *Status Epilepticus* (LEITE *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2011), os estímulos acústicos repetidos não são capazes de promover o brotamento anormal de fibras musgosas e neurodegeneração hipocampal nessa linhagem (ROMCY-PEREIRA; GARCIA-CAIRASCO, 2003).

Por outro lado, a epileptogenicidade límbica já foi demonstrada através de análises neuroetológicas e pela reorganização de terminações sinápticas glutamatérgicas não necessariamente no hipocampo, mas na amígdala e córtices perirrinal e piriforme encontradas através de análises histoquímicas em animais da linhagem WAR (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1996; GALVIS-ALONSO; OLIVEIRA, 2004).

Além da susceptibilidade às crises epiléticas, fenótipo para o qual foram inicialmente selecionados, os WARs podem apresentar uma série de comorbidades associadas. Estudos demonstraram que esses animais apresentam hipertensão arterial (FAZAN *et al.*, 2011; 2015), hiperplasia da glândula adrenal (UMEOKA *et al.*, 2011), alteração de memória (CUNHA *et al.*, 2015) e podem ainda apresentar ansiedade endógena (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1998), além de comportamentos do tipo depressivo (CASTRO *et al.*, 2017).

Garcia-Cairasco e colaboradores (1994) descreveram a presença de distúrbios no equilíbrio hidroeletrolítico em animais WAR, com alterações de fluxo urinário, diurese e natriurese. Além disso, essa linhagem apresenta menor peso corporal, hiperplasia da glândula adrenal e maiores níveis de liberação de corticosterona em resposta ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) exógeno (UMEOKA *et al.*, 2011).

Dados gerados pelo nosso grupo de pesquisa indicam que animais da linhagem WAR também apresentam déficit cognitivo precoce e hiperfosforilação anormal da proteína tau

quando comparados aos seus controles *Wistar* (PEREIRA *et al.*, 2012). Ainda no contexto das epilepsias e a DA como comorbidade associada, Mackenzie e Miller (1994) demonstraram que a incidência de placas senis em pacientes com epilepsia do lobo temporal (TLE) é maior do que em indivíduos saudáveis. Além disso, a hiperfosforilação da proteína tau também já foi identificada em diversos modelos animais de epilepsia (NICASTRO; ASSAL; SEECK, 2016), sustentando a nossa hipótese de que os WARs possam apresentar um fenótipo característico de DA.

Dentre as comorbidades apresentadas pelos WARs, alterações endócrinas e metabólicas já foram descritas. Resultados obtidos por Botion e Doretto (2003) sugerem que os WARs apresentam capacidade diminuída de armazenar glicogênio e redução do metabolismo lipídico, além de aumento das concentrações plasmáticas de glicose e lactato após crises audiogênicas. Também já foi descrito que os WARs apresentam maior expressão do transportador de glicose tipo 4 (*glucose transporter type 4- GLU4*) em tecido muscular, quando comparados aos controles *Wistars*. Acredita-se que esse aumento ocorra devido a um mecanismo compensatório para assegurar o transporte adequado de glicose (PEREIRA *et al.*, 2008). Em trabalho do nosso grupo de pesquisa, recentemente submetido (*unpublished data*), demonstramos uma série de alterações mitocondriais com efeito direto no metabolismo respiratório mitocondrial, diretamente relacionada à via de insulina e captação de glicose, dando suporte direto para investigação e entendimento dessas vias e seus impactos nos WARs, especificamente na manifestação dos fenótipos característicos de DA.

Logo, verificar se as alterações comportamentais sugestivas de alteração de memória e a hiperfosforilação de tau apresentada por WARs estão relacionadas com alterações no mecanismo de resistência à insulina, forneceria evidências para a associação com a DA, como

uma nova comorbidade desse modelo animal e contribuiria ainda para a comprovação da hipótese de que indivíduos resistentes à insulina apresentam maior risco de desenvolverem DA.

Sendo assim, hipotetizamos que as alterações de memória precoce e o aumento anormal da proteína tau fosforilada (pTau) encontrados em ratos da linhagem *WAR* estão relacionados com alterações patológicas e comportamentais características da DA. E que essas alterações podem estar relacionadas com a regulação da via de sinalização da insulina. Por conseguinte, desenvolvemos ao longo desta Dissertação uma série de ensaios comportamentais (LAM) e uma extensa investigação dos mecanismos celulares e moleculares que possam correlacionar a via de sinalização da insulina com a DA em animais da linhagem *WAR*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Validar a linhagem *WAR* como um possível modelo para o estudo da DA relacionada com alterações na regulação da via de sinalização da insulina.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar possíveis alterações no processo de consolidação da memória espacial de animais adultos e envelhecidos da linhagem *WAR*, comparando-os aos controles *Wistar*.
2. Identificar possíveis alterações na expressão de A β e tau fosforilada no hipocampo de ratos *WAR* adultos e envelhecidos, comparando-os aos controles *Wistar*.
3. Avaliar possíveis alterações na expressão de proteínas da via de sinalização de insulina, como o IR, a pIRS-1 (S321) e pGSK-3 α/β (S21/9) no hipocampo de ratos *WAR* adultos e envelhecidos, comparando-os aos controles *Wistar*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Abordagens experimentais

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da FMRP – USP protocolo nº 167/2016, e todas as normas de ética e boas práticas laboratoriais foram estritamente seguidas. Os ratos *Wistar* e *Wistar Hannover* foram provenientes do serviço de biotério do campus de Ribeirão Preto – USP e os ratos *WAR* foram provenientes do biotério de cepas especiais do serviço de biotério do campus de Ribeirão Preto – USP.

Os animais foram armazenados em caixas de polietileno com tampa de ferro cromado (40,5 x 33,5 x 21 centímetros, cm), em grupos de no máximo 4 ratos por caixa no período anterior e posterior aos testes. Os animais foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 horas, sob temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com água e ração *ad libitum*.

3.2. Delineamento Experimental

A escolha e a organização dos grupos experimentais estão descritas na Figura 3.

Figura 3 – Desenho experimental. Foram selecionados 63 animais machos, com 4 ou 17 meses de idade (grupo adulto e grupo envelhecido, respectivamente). Os animais foram submetidos ao labirinto aquático de Morris (LAM). Após dois dias, foram submetidos à eutanásia e dissecação dos cérebros. Enquanto o hemisfério esquerdo foi utilizado para o preparo dos homogenatos de proteínas que foram utilizados para o ensaio de *Western blotting*, o hemisfério direito foi processado e armazenado para realização de imunofluorescência. Foram realizadas análises quantitativas e qualitativas das proteínas Aβ, tau, pTau (S396), IR, pIRS-1 (S312) e pGSK-3α/β (S21/9).

O teste do labirinto aquático de Morris (LAM) (MORRIS, 1989) foi utilizado para avaliação do aprendizado e da memória espacial. Dois dias após a realização do LAM, os animais foram eutanasiados e tiveram seus cérebros dissecados. O hemisfério esquerdo foi armazenado rapidamente em freezer (-80°C) objetivando a detecção das proteínas Aβ, tau, pTau (S396), IR, pGSK-3 α/β (S21/9) nos extratos de hipocampus dorsal e ventral, pelo método de *Western blotting*, enquanto que o hemisfério direito foi preparado para realização de imunofluorescência em cortes congelados, para análises qualitativas da expressão de Aβ, tau fosforilada e IR no hipocampo. A expressão de pIRS-1 (S312) foi adicionalmente analisada através de ensaios de imunistoquímica (peroxidase) com a adição de 7 animais *naïve* (não submetidos ao LAM) com 4 meses de idade (n=4 WARs e n=3 Wistars).

3.3. Teste para verificação da memória espacial

Como citado, o teste do LAM foi utilizado para avaliação do aprendizado e memória espacial, em colaboração com o laboratório coordenado pelo **Prof. Dr. Sebastião de Sousa Almeida**, do Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Esse teste consiste em um modelo de navegação espacial no qual o rato nada para encontrar uma plataforma escondida, utilizando apenas pistas visuais. Neste contexto, o comportamento natural do animal é escapar da água. O teste é baseado na ideia de que os roedores tendem a utilizar o caminho mais rápido e mais curto para escapar do ambiente aquático (WENK, 2004), como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 – Desenho representativo do labirinto aquático de Morris. Em a) pode ser observada a trajetória realizada pelo animal antes do processo de aprendizagem, já em b) observamos uma trajetória bem definida após o processo de aprendizado, demonstrando sua consolidação. (Adaptado de BEAR *et al.*, 2007).

Antes da realização do teste, os animais passaram por um período de habituação de dois dias. No segundo dia de habituação, foi realizado o *handling* ou manuseio de todos os animais para diminuir o risco de estresse durante o teste. O *handling* foi realizado pelo mesmo experimentador que executou os testes e consistiu em 3 manipulações diárias com duração de 5 minutos/cada durante um dia, totalizando 15 minutos.

Para a realização do teste, utilizou-se um tanque circular de 1,5 m de diâmetro e 39 cm de altura esmaltado com tinta preta. O aparato foi preenchido com água e dividido em quatro quadrantes imaginários enumerados em sentido horário (Q1, Q2, Q3 e Q4), com três possíveis pontos de largada (*Freezone 2*, *Freezone 3* e *Freezone 4*, Figura 5).

Uma plataforma circular esmaltada com tinta preta com 12 cm de diâmetro e 25 cm de altura foi posicionada dois centímetros abaixo da superfície da água (~22° C) no centro do quadrante Q1 (Figura 3). Os animais foram estimulados a localizar a plataforma submersa utilizando apenas pistas externas visuais fixadas nas paredes da sala (MORRIS, 1989; LAMBERTY; KLITGAARD, 2000; ANISMAN; MCINTYRE, 2002; SZYNDLER *et al.*, 2006; SHERAFAT *et al.*, 2013).

Figura 5 – Modelo Esquemático do labirinto aquático de Morris (LAM). O aparato consiste em um tanque circular preto dividido em quatro quadrantes imaginários (Q1, Q2, Q3 e Q4), com três possíveis pontos de partida (*Freezone 2*, *Freezone 3* e *Freezone 4*). Uma plataforma circular foi posicionada dois centímetros abaixo da superfície da água no centro do quadrante Q1.

O teste consistiu de 6 treinos sequenciados durante 4 dias (ou sessões), e 4 tentativas adicionais (*Probe trial* além dos retestes 1, 2 e 3), totalizando 28 tentativas, que seguiram a mesma sequência padrão para largada (Tabela 1). A cada tentativa, o animal foi colocado em

um ponto de largada diferente do último, exceto na *Probe Trial* e nos retestes, nos quais os animais sempre partiam do mesmo ponto de largada (*Freezone 3*). E em todas as tentativas, os ratos foram colocados individualmente, de costas para o centro do tanque.

Tabela 1 – Sequência padrão de tentativas e pontos de largada durante as sessões experimentais do Labirinto Aquático de Morris (LAM).

Tentativas	Ponto de largada (<i>freezones</i>)	Sessões Experimentais
1	2	1
2	4	1
3	3	1
4	4	1
5	2	1
6	3	1
7	4	2
8	2	2
9	3	2
10	4	2
11	2	2
12	3	2
13	4	3
14	3	3
15	2	3
16	4	3
17	3	3
18	2	3
19	3	4
20	2	4
21	4	4
22	2	4
23	3	4
24	4	4
25 (<i>Probe Trial</i>)	3	4
26 (Reteste 1)	3	4
27 (Reteste 2)	3	5
28 (Reteste 3)	3	6

Foi estabelecido o tempo de 60 segundos para o animal encontrar a plataforma de fuga, exceto nos retestes, que tiveram uma duração máxima de 180 segundos. O teste era finalizado quando o rato encontrava a plataforma e permanecia sobre ela durante 30 segundos. Quando o

animal não encontrava a plataforma dentro do tempo estabelecido, o teste era encerrado e o animal era colocado sobre a mesma, durante 30 segundos.

Assim como, como ser observado na Figura 6, os animais eram recolocados imediatamente na piscina, até completarem 6 testes ao dia, concluindo uma sessão experimental. Mas, na 25^a tentativa, realizada na quarta sessão experimental, a plataforma era removida e os animais foram monitorados quanto à exploração do quadrante alvo (Q1) (*Probe Trial*). Imediatamente após a *Probe Trial*, foi realizado o primeiro reteste ou 26^a tentativa, na qual a plataforma foi novamente inserida no centro do quadrante alvo, e os animais foram reintroduzidos individualmente em uma única tentativa no tanque, a fim de verificar o aprendizado e a memorização espacial de curto prazo. Para avaliação do aprendizado e memória espacial de longo prazo, realizou-se um segundo reteste (27^a tentativa) 24 horas após a *Probe Trial* na quinta sessão experimental e um terceiro reteste uma semana após a *Probe Trial*, no 11^a dia de teste ou 6^a sessão experimental. (MORRIS, 1989; LAMBERTY; KLITGAARD, 2000; ANISMAN; MCINTYRE, 2002; SZYNDLER *et al.*, 2006; SHERAFAT *et al.*, 2013).

Em seguida, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo para localizar a plataforma de fuga (latência), velocidade média de natação, distância calculada (latência x velocidade) e ocupação do quadrante alvo, utilizando o *software Automatic Tracer Ethovision (Noldus)*.

Figura 6 – Representação cronológica do protocolo experimental. O protocolo experimental delineado neste estudo teve duração de 16 dias. Inicialmente, os animais passaram por um período de habituação de dois dias. No segundo dia de habituação, foi realizado o handling. Posteriormente, os animais passaram por 4 dias de treinamento no Labirinto Aquático de Morris (LAM). No quarto dia de treinamento ou sexto dia de protocolo, foram realizadas duas tentativas adicionais: uma probe trial e um reteste. No dia seguinte, 24 horas após a probe trial, realizou-se o segundo reteste. Uma semana após a probe trial, realizou-se o terceiro reteste, finalizando o LAM. Os animais passaram novamente por dois dias de habituação e foram eutanasiados no décimo sexto dia de protocolo experimental.

3.4. Western Blotting

Preparo do homogenato cerebral de rato

Os ensaios de *Western blotting* foram realizados em colaboração com o laboratório dirigido pela Professora **Enilza Maria Espreafico** do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP/USP. Após a finalização do LAM, os ratos foram eutanasiados por inalação com isoflurano (*BioChimico*) e decapitados. Seus cérebros foram dissecados e o hemisfério esquerdo foi armazenado para realização de *Western blotting*. O hipocampo esquerdo foi dividido em extratos ventral (HV) e dorsal (HD). Pelo menos 5 animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para análise. Os tecidos que foram previamente armazenados em freezer a -80°C (em microtubo de 1,5 mL) foram pesados em balança semi-analítica (BEL – modelo Mark 330). Para uma amostra de 50 mg, foram acrescentados 200 μL de tampão PEB (*protein extraction buffer*) constituído por 5 ml de tampão GTP 10x para cada 50 ml de volume final (Tris 100mM pH 7,6; EDTA 20 mM; NaCl 1,5M) acrescido de 125 μL de Triton X-100; 125 μL de NP-40 gelado. No momento do uso, foi suplementado com coquetel de inibidores de protease (código: 78429, Sigma-Aldrich®)

diluído 1:100 e inibidores de fosfatase NaF 1:50 e Na₃VO₄ (ortovanadato de sódio, código: S6508, Sigma-Aldrich) 1:10. Posteriormente, as amostras foram sonicadas com pulsos de 10:10; Ampl 35% durante 10 segundos, repetindo 3 ciclos. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C (Centrifuga 5810R Eppendorf) e o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL e congelados a -80° C até o momento do uso. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para dosagem de proteínas totais (SMITH *et al.*, 1995) utilizando o kit comercial Pierce TM BCA Protein (ThermoFisher – 23225), seguindo as instruções do fabricante.

SDS-PAGE

Foram preparados géis de poliacrilamida de 1 mm de espessura na concentração de 12%, partindo das soluções estoque [30% bis Acrilamida, Tris HCl 10x pH 6,8 (para gel de empilhamento) ou pH 8,8 (gel de separação), 10% SDS, 10% persulfato de amônio e TEMED]. Após a polimerização dos géis, pipetou-se nos poços 50 µg de proteína total (12 µL de volume final) de cada amostra de homogenato, diluído em tampão de amostra desnaturante (0,313 M Tris HCl pH 6,8, 10% SDS, 10 % sacarose ou glicerol e uma pequena quantidade de azul de bromofenol) 5x concentrado. A corrida eletroforética foi feita em cuba de eletroforese vertical (Mini-PROTEAN®, Bio-Rad) com voltagem constante de 90 volts em tampão de corrida (25 mM Tris base, 190 mM glicina e 0,1% SDS).

Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose

As proteínas foram transferidas por eletroforese seguindo o protocolo Towbin e colaboradores (1979) por 4 horas em 35 volts a 4°C para uma membrana de nitrocelulose (BioRad), utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; etanol 18,5% e SDS 0,1%).

Bloqueio, incubação com anticorpos e revelação

A etapa subsequente à transferência consistiu na incubação da membrana, sob agitação constante, em solução de bloqueio 3% BSA (*Sigma-Aldrich®*) diluída em solução TBS-T 1x (TBS suplementado com 0,05% de *Tween* 20, *Sigma-Aldrich®*). Após incubação por 1 hora, a membrana foi lavada uma vez com TBS-T 1x sob agitação, e foi procedida a incubação com solução dos seguintes anticorpos primários *anti-beta amyloid* (*ab216436*) (*abcam®*), *Anti-Tau* (*phospho S396*) *antibody* [*EPR2731*] (*ab109390*) (*abcam®*), *Anti-Tau antibody* [*E178*] (*ab32057*) (*abcam®*), *Insulin R β antibody* (*c-19*): *sc-711* e *Phospho-GSK-3 α/β* (*Ser21/9*) *Antibody* #9331 em solução 2,5% BSA/TBS-T (as concentrações especificadas pelos fabricantes foram utilizadas), sob agitação a 4°C *overnight* (12-16 horas) ou por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada 3x com TBS-T por 10 minutos cada. Finalmente, a membrana foi incubada com solução do anticorpo secundário (anti IgG de coelho ou camundongo, conjugado com HRP) diluída (1:3000) em solução 2,5% BSA/TBS-T, sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente.

Passado o tempo indicado, a membrana foi lavada como já descrito. Os reagentes foram revelados utilizando-se o kit *ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent* (*GE Healthcare Life Sciences*). Inicialmente foram misturados 150 μ L de cada um dos reagentes (A) *Luminol Solution ECL Select* e (B) *Peroxidase Solution ECL Select* em um microtubo, sendo a solução resultante aplicada diretamente sobre a membrana, a qual permaneceu em incubação por 5 minutos em contato com os reagentes. A captação do sinal de quimioluminescência foi realizada no aparelho fotodocumentador *ImageQuant LAS 4000 series* – (*GE Healthcare Life Sciences*) acoplado ao sistema digital, através do *software* *ImageQuant LAS 4000* (*GE Healthcare Life Sciences*).

3.5. Ensaios de Imunoistoquímica

Fluorescência

Como já descrito acima, após a finalização do LAM, os ratos foram eutanasiados e tiveram seus cérebros dissecados. Esses animais não passaram por processo de perfusão transcardíaca, portanto, os hemisférios direito desses ratos foram imersos em PFA 4% por 48 horas para fixação. Em seguida, os tecidos foram transferidos para solução de crioproteção, contendo 30% de sacarose em PBS, e mantidos a 4°C até submergirem, por fim, foram congelados em isopentano 99% (Vetec®) resfriado em gelo seco. Após o congelamento, os hemisférios foram armazenados no congelador a -20°C.

Utilizou-se um criostato *Microm* HM-5005-E, com temperatura variando de -22°C a -18°C, para secção de cortes coronais com 40 µm de espessura. Os cortes foram imediatamente dispostos em lâminas gelatinizadas, as quais foram armazenadas no congelador a -20°C até a realização do ensaio. As secções seriadas do hipocampo foram coletadas a partir da coordenada anteroposterior -2,12 mm até -6,3 mm referente ao Bregma (PAXINOS; WATSON, 1997), totalizando 8 lâminas com 12 cortes para cada animal.

Inicialmente, as lâminas foram lavadas com PBS por duas vezes de 5 minutos. Em seguida, o tecido foi permealizado com Triton 0,3% em PBS e os aldeídos livres foram bloqueados com 100 mM Glicina em PBS. Realizaram-se outras duas lavagens com PBS e o bloqueio de sítios inespecíficos com albumina bovina (BSA) 3% por duas horas. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários *anti-beta amyloid* (ab216436) (abcam®), *Anti-Tau (phospho S396) antibody [EPR2731]* (ab109390) (abcam®) e *Insulin Rβ Antibody (C-4): sc-373975* (Santa Cruz®) diluídos em solução bloqueio BSA (3%), seguindo as concentrações especificadas pelos fabricantes, e incubadas à temperatura ambiente por 16 horas (*overnight*).

No dia seguinte, as lâminas foram novamente lavadas por 3 vezes de 5 minutos com PBS e incubadas com os anticorpos secundários *Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG*, *Alexa* ou *Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG*, na proporção de 1:500 diluídos em solução bloqueio BSA (2%) por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 3x com PBS e os núcleos foram corados com DAPI, diluído em PBS na proporção de 1:5000 por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS por três vezes e montadas com fluoromount G e armazenadas a 4°C. As imagens foram capturadas por um microscópio confocal ZEISS LSM 780. O processamento das imagens foi realizado através do software Icy Bioimage. Apenas 2 animais do grupo envelhecido (um *Wistar* e um *WAR*) foram aleatoriamente selecionados para captura de imagens e análise qualitativa. Entretanto, as imagens dos demais animais serão futuramente capturadas para análises quantitativas.

Peroxidase

A fim de comparar a expressão de pIRS1 (S312) em hipocampo de ratos *Wistar* e *WAR*, ambos *naïve*, foram utilizados tecidos cerebrais de sete animais (n=03 e n=04, respectivamente) com quatro meses de idade, armazenados em solução anti-congelante (50% de tampão fosfato 50 mM, 30% de etilenoglicol e 20% de glicerina), em congelador a -20°C, após perfusão intracardíaca com solução de tampão fosfato salina (PBS, 100 mM, pH 7,4) seguida de solução de paraformaldeído (PFA) 4% em PBS.

Para a realização da técnica de imunoistoquímica foram selecionadas somente secções seriadas do hipocampo, de 40 µm de espessura, a partir da coordenada anteroposterior -2,12 mm até -6,3 mm referente ao bregma (PAXINOS & WATSON, 1997).

Inicialmente, as secções foram lavadas em PBS, para a retirada do excesso de solução anti-congelante, e permeabilizadas em solução de PBS contendo Triton X-100 0,2% (v/v) por 5 minutos. Em seguida, as secções foram incubadas em solução de H₂O₂ 4,5%, metanol 10% e

PBS por 30 minutos, para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Para minimizar a interação do anticorpo primário com sítios de ligação inespecífica no tecido, as secções foram incubadas em PBS contendo Triton X-100 0,2% (v/v) e albumina do soro bovino (BSA) 4% (v/v) (tampão de bloqueio), durante duas horas. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário *Phospho-IRS1 (S312) Antibody* (Cusabio®) diluído em tampão de bloqueio a 1:500 (v/v) em temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas, *overnight*.

No dia seguinte, as secções foram lavadas em PBS e em seguida incubadas com o anticorpo secundário *Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody* (Vector Laboratories®) diluído em tampão de bloqueio a 1:1000 (v/v), durante duas horas, em temperatura ambiente. As secções foram então lavadas em PBS e incubadas, por uma hora, com ABC Elite kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) diluído em PBS a 1:800 (v/v).

A detecção foi baseada na reação da peroxidase utilizando-se H₂O₂ e 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Após atingirem a coloração desejada (dentro de 12 minutos) as secções foram imersas em água destilada no intuito de interromper a reação. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5% e sulfato de cromo-alumínio 0,05%) e, após secarem, foram desidratadas em banhos crescentes de álcool, diafanizadas com banhos de xilol e cobertas com lamínulas, utilizando-se como meio de montagem o *Entellan* (Merck).

As secções foram analisadas, e suas imagens adquiridas, através de um sistema de visualização, aquisição e análise composto pelo microscópio *Zeiss Axiovert 100* e pelo *software Axiovision*. Todas as imagens foram capturadas sob as mesmas condições de luz, saturação e contraste.

Para a contagem do número de células marcadas pela imunoistoquímica (DAB) foi utilizado o software Fiji (2011, NIH, freeware), e também o *plug-in cell counter* (Kurt De Vos,

2010) que permitiu a contagem manual de células positivas para *Phospho-IRS1 (S312)* no Giro Denteado, Hilus, CA3, CA2 e CA1 dos hipocampus direito e esquerdo de cada animal.

3.6. Injeção e quantificação de oligômeros de A β (A β Os)

A preparação de A β Os foi realizada em colaboração com o laboratório do **Prof. Dr. Adriano Sebollela** do Departamento de Bioquímica FMRP-USP, de acordo com protocolo já estabelecido (FORNY-GERMANO *et al.*, 2014). Para isso, 12 animais *Wistar* (n= 6 com 1 mês de idade e 6 com 3 meses de idade) e 11 animais *WAR* (todos com 3 meses de idade) foram injetados com veículo (DMSO 2% em PBS) ou com oligômeros de A β -42 humano sintético (*Anaspec 20276-1*) (1 μ g em 4,4 μ l) no ventrículo lateral direito, e, 48 horas após inoculação, foram submetidos aos testes de reconhecimento de objetos e LAM para avaliação da memória.

Os hipocampus de animais *WAR* submetidos à injeção intracerebroventricular de veículo e A β O foram dissecados após a realização dos testes de memória. Realizou-se a detecção dos níveis de A β O injetado na fração solúvel dos extratos não-desnaturantes de hipocampo (n=6 *WAR* veículo e 6 *WAR* A β O) através do método de Elisa com o kit *Human A β 42 ELISA (catalog number KHB3441- ThermoFisher)*, seguindo recomendações do fabricante. Os resultados obtidos (gráfico em anexo; Figura 50) indicam que, embora o ensaio tenha sido eficaz na detecção do A β -42 humano sintético, as amostras de hipocampo de animais tratados com veículo e A β O não apresentaram sinais significativamente diferentes entre si, sugerindo a necessidade de modificações no protocolo.

3.7. Análise estatística

Para análise das estratégias de navegação baseadas nos parâmetros latência, distância calculada e velocidade no LAM durante as 24 tentativas do período de treinamento, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de *Bonferroni* para comparações múltiplas.

Para comparação dos parâmetros latência, distância calculada e velocidade entre grupos *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR* adultos nos retestes ou ocupação do quadrante alvo, distância calculada e velocidade na *Probe Trial*, utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. Para comparação dos parâmetros latência, distância calculada e velocidade entre grupos *Wistar* e *WAR* envelhecidos nos retestes ou ocupação do quadrante alvo, distância calculada e velocidade na *Probe Trial*, utilizou-se o teste de *Mann-Whitney*.

Os dados de *Western Blotting* foram quantificados pela densitometria das bandas, utilizando o software *ImageJ* e comparados pelo teste *t de student* não paramétrico.

Para a contagem manual do número de células marcadas pela imunoistoquímica (DAB) foi utilizado o software *Fiji* (2011, NIH, freeware) e o *plug-in cell counter* (Kurt De Vos, 2010). Os resultados da quantidade de células reativas a *Phospho-IRS1 (S312)*, nos animais *Wistar* e *WAR*, foram expressos em média ($\pm$ S.E.M). Utilizou-se o teste *t de Student*, para verificar se houve diferença estatística entre os grupos.

Toda a análise estatística foi realizada através do software estatístico *GraphPad Prism* 6. Os valores de *p* iguais ou inferiores a 5% foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Labirinto aquático de Morris (LAM)

O LAM foi utilizado para avaliar os efeitos no aprendizado e memória espacial entre animais WAR e *Wistar* ou *Wistar Hannover* (Hannover) adultos (4 meses de idade) e WAR e *Wistar* envelhecidos (17 meses de idade).

4.1.1. Labirinto aquático de Morris – Grupo adulto.

Para o grupo adulto (4 meses de idade), como resultado comportamental da 1ª-24ª tentativa, verificamos que houve diferença significativa entre as linhagens ($***p<0,001$) e tentativas ($***p<0,001$) para os parâmetros latência e distância calculada. Para o parâmetro velocidade, encontramos diferença significativa entre as linhagens ($**p<0,01$), tentativas ($***p<0,001$) e interação ($***p<0,001$).

Durante o período de treinamento (24 tentativas), as linhagens WAR e *Wistar Hannover* apresentaram latência significativamente maior que os animais *Wistar* ($***p<0,001$; $**p<0,01$, respectivamente; Figura 7).

Figura 7 – Latência dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Navegação espacial de animais adultos durante quatro dias de seis tentativas, no LAM, para Latência, com diferenças entre $***$ linhagens e $***$ tentativas. *Two way*-ANOVA, medidas repetidas, *Bonferroni*. $***p<0,001$.

As linhagens WAR e *Wistar Hannover* também apresentaram maior distância calculada (** $p<0,01$ e * $p<0,05$, respectivamente; Figura 8) e menor velocidade de natação (** $p<0,01$ e ** $p<0,01$, respectivamente; Figura 9) quando comparados aos animais *Wistar*. As diferenças entre WAR e *Wistar Hannover* não foram significativas (ns; $p>0,05$). As diferenças observadas entre as linhagens durante o período de treinamento estão melhor descritas nas Tabelas 2-4.

Figura 8 – Distância calculada dos animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Navegação espacial de animais adultos durante quatro dias de seis tentativas, no LAM, para Distância Calculada, com diferença entre ***linhagens e ***tentativas. *Two way-ANOVA*, medidas repetidas, *Bonferroni*. *** $p<0,001$.

Figura 9 – Velocidade dos animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Navegação espacial de animais adultos durante quatro dias de seis tentativas, no LAM, para Velocidade, com diferenças entre **linhagens, ***tentativas e ***interação. *Two way-ANOVA*, medidas repetidas, *Bonferroni*. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Tabela 2 – Comparações entre animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR* adultos (4 meses de idade) durante o período de treinamento (24 tentativas). Valores obtidos através de Anova *Two way*, medidas repetidas, pós-teste de *Bonferroni* (ns $p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Parâmetros	Média $\pm$ erro padrão			Comparações		
	<i>Wistar</i>	<i>Wistar Hannover</i>	<i>WAR</i>	<i>Wistar</i> x <i>Wistar Hannover</i>	<i>Wistar</i> x <i>WAR</i>	<i>Wistar Hannover</i> x <i>WAR</i>
Latência (s)	20,02 $\pm$ 1,40	36,97 $\pm$ 1,55	34,09 $\pm$ 1,89	***	**	ns
Distância Calculada (cm)	462,1 $\pm$ 33,74	773,3 $\pm$ 49,59	719,6 $\pm$ 57,37	**	*	ns
Velocidade (cm/s)	23,58 $\pm$ 0,48	20,36 $\pm$ 0,69	20,56 $\pm$ 0,94	**	**	ns

Tabela 3 – Comparações entre animais *Wistar* e *Wistar Hannover* adultos (4 meses de idade). Valores obtidos através de Anova *Two way*, medidas repetidas, pós-teste de *Bonferroni* (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Parâmetros	Fonte de variação: tentativas	<i>p value</i>
Latência	8	***
Latência	9	***
Latência	11	*
Latência	12	**
Latência	19	*
Latência	20	**
Latência	21	**
Distância Calculada	2	*
Distância Calculada	8	*
Distância Calculada	9	**
Velocidade	14	**
Velocidade	15	**
Velocidade	16	*
Velocidade	18	*
Velocidade	19	**

Tabela 4 – Comparações entre animais *Wistar* e *WAR* adultos (4 meses de idade). Valores obtidos através de Anova *Two way*, medidas repetidas, pós-teste de *Bonferroni* (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Parâmetros	Fonte de variação: tentativas	<i>p value</i>
Latência	10	**
Latência	12	*
Latência	14	*
Distância Calculada	8	*
Distância Calculada	10	*
Velocidade	11	*
Velocidade	17	*
Velocidade	18	**
Velocidade	23	*
Velocidade	24	*

Na *Probe Trial* (25ª Tentativa), não observamos diferença significativa entre as linhagens *WAR*, *Wistar Hannover* e *Wistar* e para ocupação do quadrante alvo ($p>0,05$; Figura 10). Os animais *WAR* apresentaram menor distância calculada (** $p<0,01$; Figura 11) e menor velocidade de natação quando comparados aos controles *Wistar* (** $p<0,01$; Figura 12). As diferenças observadas entre as linhagens durante a *Probe Trial* estão melhor descritas na Tabela 5.

Figura 10 – Ocupação do quadrante alvo por animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR* durante a *Probe Trial*. Navegação espacial de animais adultos durante a *Probe Trial* (25ª tentativa) no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Ocupação do quadrante alvo (Q1) de animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR*. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. $p>0,05$.

Figura 11 – Distância calculada animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante a *Probe Trial*. Navegação espacial de animais adultos durante a *Probe Trial* (25ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Distância Calculada de animais Wistar, Wistar Hannover e WAR. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. ** $p < 0,01$.

Figura 12 – Velocidade de animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante a *Probe Trial*. Navegação espacial de animais adultos durante a *Probe Trial* (25ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Velocidade de natação de animais Wistar, Wistar Hannover e WAR. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. ** $p < 0,01$.

Tabela 5 – Comparações entre animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR* adultos (4 meses de idade) durante a Probe Trial (25ª tentativa). Valores obtidos através do teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. (ns $p>0,05$; ** $p<0,01$).

Parâmetros	Média $\pm$ erro padrão			Comparações		
	<i>Wistar</i>	<i>Wistar Hannover</i>	<i>WAR</i>	<i>Wistar</i> x <i>Wistar Hannover</i>	<i>Wistar</i> x <i>WAR</i>	<i>Wistar Hannover</i> x <i>WAR</i>
Ocupação do Quadrante alvo (s)	20,44 $\pm$ 1,54	18,92 $\pm$ 1,58	22,98 $\pm$ 1,71	ns	ns	ns
Distância Calculada (cm)	1463 $\pm$ 37,11	1343 $\pm$ 44,78	1276 $\pm$ 99,25	ns	**	ns
Velocidade (cm/s)	24,41 $\pm$ 0,62	22,41 $\pm$ 0,74	21,30 $\pm$ 1,65	ns	**	ns

No primeiro reteste ou 26ª tentativa, observamos que os animais *WAR* apresentaram maior latência quando comparados aos animais *Wistar* (* $p<0,05$; Figura 13). Para o parâmetro distância calculada, não encontramos diferença significativa entre as linhagens *WAR*, *Wistar Hannover* e *Wistar* ($p>0,05$; Figura 14). Para o parâmetro velocidade, as linhagens *WAR* e *Wistar Hannover* apresentaram menor velocidade de natação que a linhagem *Wistar* (* $p<0,05$ e *** $p<0,001$, respectivamente; Figura 15). As diferenças observadas entre as linhagens durante o primeiro reteste estão melhor descritas na Tabela 6.

Figura 13 – Latência dos animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR* durante o primeiro reteste. Navegação espacial de animais adultos durante o reteste 1 (26ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Latência para encontrar a plataforma de animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR*. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. * $p<0,05$.

Figura 14 – Distância Calculada dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o primeiro reteste. Navegação espacial de animais adultos durante o reteste 1 (26ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Distância Calculada de animais Wistar, Wistar Hannover e WAR. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. $p > 0,05$.

Figura 15 – Velocidade dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o primeiro reteste. Navegação espacial de animais adultos durante o reteste 1 (26ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Velocidade de natação de animais Wistar, Wistar Hannover e WAR. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Tabela 6 – Comparações entre animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR* adultos (4 meses de idade) durante o primeiro reteste (26ª tentativa). Valores obtidos através do teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn* (ns $p>0,05$; * $p<0,05$; *** $p<0,001$).

Parâmetros	Média ± erro padrão			Comparações		
	<i>Wistar</i>	<i>Wistar Hannover</i>	<i>WAR</i>	<i>Wistar</i> x <i>Wistar Hannover</i>	<i>Wistar</i> x <i>WAR</i>	<i>Wistar Hannover</i> x <i>WAR</i>
Latência (s)	26,20±6,94	39,41±6,57	57,81±13,81	ns	*	ns
Distância Calculada (cm)	585±152	745±135,84	1005±239,2	ns	ns	ns
Velocidade (cm/s)	22,71±1,03	18,23±0,66	16,64±1,3	*	***	ns

No segundo reteste ou 27ª tentativa, as linhagens *WAR* e *Wistar Hannover* apresentaram maior latência (*** $p<0,001$ para ambos; Figura 16), maior distância calculada (*** $p<0,001$ e ** $p<0,01$, respectivamente; Figura 17) e menor velocidade (*** $p<0,001$ para ambos; Figura 18) que a linhagem *Wistar*. As diferenças observadas entre as linhagens durante o segundo reteste estão melhor descritas na Tabela 7.

Figura 16 – Latência dos animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR* durante o segundo reteste. Navegação espacial de animais adultos durante o reteste 2 (27ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Latência para encontrar a plataforma de animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR*. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. *** $p<0,001$.

Figura 17 – Distância Calculada dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o segundo reteste. Navegação espacial de animais adultos durante o reteste 2 (27ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Distância Calculada de animais Wistar, Wistar Hannover e WAR. Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Figura 18 – Velocidade dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o segundo reteste. Navegação espacial de animais adultos durante o reteste 2 (27ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Velocidade de natação de animais Wistar, Wistar Hannover e WAR. Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn. *** $p<0,001$.

Tabela 7 – Comparações entre animais Wistar, Wistar Hannover e WAR adultos (4 meses de idade) durante o segundo reteste (27ª tentativa). Valores obtidos através do teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (ns $p>0,05$; * $p<0,05$; *** $p<0,001$).

Parâmetros	Média $\pm$ erro padrão			Comparações		
	Wistar	Wistar Hannover	WAR	Wistar x Wistar Hannover	Wistar x WAR	Wistar Hannover x WAR
Latência (s)	6,07 $\pm$ 0,61	60,25 $\pm$ 10,93	36,02 $\pm$ 9,25	****	***	ns
Distância Calculada (cm)	163,9 $\pm$ 16,11	1053 $\pm$ 243,7	572,4 $\pm$ 153	****	**	ns
Velocidade (cm/s)	27,34 $\pm$ 0,73	17,65 $\pm$ 1,5	18,67 $\pm$ 1,65	***	***	ns

No terceiro reteste ou 28ª tentativa, não encontramos diferença significativa entre as linhagens *WAR*, *Wistar Hannover* e *Wistar*, para os parâmetros latência (Figura 18) e distância calculada ($p>0,05$; Figura 19). As linhagens *WAR* e *Wistar Hannover* apresentaram menor velocidade de natação quando comparados à linhagem *Wistar* ($*p<0,05$ e $**p<0,001$, respectivamente; Figura 20). As diferenças observadas entre as linhagens durante o terceiro reteste estão melhor descritas na Tabela 8.

Figura 19 – Latência dos animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR* durante o terceiro reteste. Navegação espacial de animais adultos durante o reteste 3 (28ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Latência para encontrar a plataforma de animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR*. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. $p>0,05$.

Figura 20 – Distância Calculada dos animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR* durante o terceiro reteste. Navegação espacial de animais adultos durante o reteste 3 (28ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Distância Calculada de animais *Wistar*, *Wistar Hannover* e *WAR*. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. $p>0,05$.

Figura 21 – Velocidade dos animais Wistar, Wistar Hannover e WAR durante o terceiro reteste. Navegação espacial de animais adultos durante o reteste 3 (28ª tentativa), no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Velocidade de natação de animais Wistar, Wistar Hannover e WAR. *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Tabela 8 – Comparações entre animais Wistar, Wistar Hannover e WAR adultos (4 meses de idade) durante o terceiro reteste (28ª tentativa). Valores obtidos através do teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Parâmetros	Média ± erro padrão			Comparações		
	Wistar	Wistar Hannover	WAR	Wistar x Wistar Hannover	Wistar x WAR	Wistar Hannover x WAR
Latência	37,22±13,67	49,33±13,79	36,01±7,54	ns	ns	ns
Distância Calculada (cm)	783,2±253	803,3±238,2	484,9±90,27	ns	ns	ns
Velocidade (cm/s)	23,39±1,08	17,06±1,19	15,28±1,16	*	***	ns

4.1.2. Labirinto aquático de Morris – Grupo envelhecido

Para o grupo envelhecido (17 meses de idade), como resultado comportamental da 1ª-24ª tentativa, verificamos que houve diferença significativa entre as linhagens (** $p < 0,01$) e tentativas (*** $p < 0,001$) para os parâmetros latência e velocidade, e apenas entre as tentativas para o parâmetro distância calculada (*** $p < 0,001$).

Os animais *WAR* apresentaram maior latência (** $p<0,01$; Figura 21) e menor velocidade de natação (** $p<0,01$; Figura 22) durante o período de treinamento (24 tentativas), quando comparados aos seus controles *Wistar*. Não houve diferença significativa entre as linhagens *WAR* e *Wistar* para o parâmetro distância calculada ($p>0,05$; Figura 23). As diferenças observadas entre as linhagens *WAR* e *Wistar* durante o período de treinamento estão melhor descritas na Tabela 9.

Figura 22 – Latência dos animais *Wistar* e *WAR* durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Navegação espacial de animais envelhecidos durante quatro dias de seis tentativas, no LAM, para Latência, com diferenças entre **linhagens e ***tentativas. *Two way-ANOVA*, medidas repetidas, *Bonferroni*. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Figura 23 – Distância Calculada dos animais *Wistar* e *WAR* durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Navegação espacial de animais envelhecidos durante quatro dias de seis tentativas, no LAM, para Distância Calculada, com diferenças entre ***tentativas. *Two way-ANOVA*, medidas repetidas, *Bonferroni*. *** $p<0,001$.

Figura 24 – Velocidade dos animais Wistar e WAR durante o período de treinamento do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Navegação espacial de animais envelhecidos durante quatro dias de seis tentativas, no LAM, para Velocidade, com diferenças entre **linhagens e ***tentativas. *Two way-ANOVA*, medidas repetidas, *Bonferroni*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 9 – Comparação entre animais Wistar, e WAR envelhecidos (17 meses de idade) durante o período de treinamento (24 tentativas). Valores obtidos através de Anova *Two way*, medidas repetidas, pós-teste de *Bonferroni* (ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$).

Parâmetros	Média $\pm$ erro padrão		Comparação Wistar $\times$ WAR
	Wistar	WAR	
Latência (s)	28,78 $\pm$ 1,56	38,82 $\pm$ 3,15	**
Distância Calculada (cm)	596,3 $\pm$ 34,73	701,7 $\pm$ 56,27	ns
Velocidade (cm/s)	20,97 $\pm$ 0,51	18,24 $\pm$ 0,68	**

Na *Probe Trial* (25ª Tentativa) não encontramos diferença significativa entre as linhagens WAR e Wistar para ocupação do quadrante alvo ($p > 0,05$; Figura 25). Mas, quando comparados aos controles Wistar, a linhagem WAR apresentou menor distância calculada (** $p < 0,01$; Figura 24) e menor velocidade de natação (** $p < 0,01$; Figura 25). As diferenças

observadas entre as linhagens *Wistar* e *WAR* durante a *Probe Trial* são melhores descritas na Tabela 10.

Figura 25 – Ocupação do quadrante alvo por animais *Wistar* e *WAR* durante a *Probe Trial*. Navegação espacial de animais envelhecidos durante a *Probe Trial* (25ª tentativa) no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Ocupação do quadrante alvo (Q1) de animais *Wistar* e *WAR*. *Mann-Whitney*. $p > 0,05$.

Figura 26 – Distância Calculada de animais *Wistar* e *WAR* durante a *Probe Trial*. Navegação espacial de animais envelhecidos durante a *Probe Trial* (25ª tentativa) no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Distância Calculada de animais *Wistar* e *WAR*. *Mann-Whitney*. $**p < 0,01$.

Figura 27 – Velocidade de animais *Wistar* e *WAR* durante a *Probe Trial*. Navegação espacial de animais envelhecidos durante a *Probe Trial* (25ª tentativa) no Labirinto Aquático de Morris (LAM): Velocidade de animais *Wistar* e *WAR*. *Mann-Whitney*. $**p < 0,01$.

Tabela 10 – Comparação entre animais *Wistar*, e *WAR* envelhecidos (17 meses de idade) durante a *Probe Trial* (25ª tentativa). Valores obtidos através do teste de *Mann-Whitney* (ns $p>0,05$; ** $p<0,01$).

Parâmetros	Média $\pm$ erro padrão		Comparação <i>Wistar</i> $\times$ <i>WAR</i>
	<i>Wistar</i>	<i>WAR</i>	
Ocupação do quadrante alvo (s)	19,39 $\pm$ 2,28	18,26 $\pm$ 2,01	ns
Distância Calculada (cm)	1196 $\pm$ 32,31	947,5 $\pm$ 81,42	**
Velocidade (cm/s)	19,89 $\pm$ 0,5	15,82 $\pm$ 1,35	**

Observamos que no primeiro reteste ou 26ª tentativa os animais *WAR* apresentaram maior latência (** $p<0,01$; Figura 28), maior distância calculada ($*p<0,05$; Figura 29) e menor velocidade de natação (** $p<0,01$; Figura 30) quando comparados aos seus controles *Wistar*. As diferenças observadas entre as linhagens *WAR* e *Wistar* durante o primeiro reteste são melhor descritas na Tabela 11.

Figura 28 – Latência de animais *Wistar* e *WAR* durante o primeiro reteste. Navegação espacial de animais envelhecidos durante o reteste 1 (26ª tentativa) no Labirinto Aquático de Morris: Latência para encontrar a plataforma de animais *Wistar* e *WAR*. *Mann-Whitney*. ** $p<0,01$.

Figura 29 – Distância Calculada de animais Wistar e WAR durante o primeiro reteste. Navegação espacial de animais envelhecidos durante o reteste 1 (26ª tentativa) no Labirinto Aquático de Morris: Distância Calculada de animais Wistar e WAR. Mann Whitney. * $p < 0,05$.

Figura 30 – Velocidade de animais Wistar e WAR durante o primeiro reteste. Navegação espacial de animais envelhecidos durante o reteste 1 (26ª tentativa) no Labirinto Aquático de Morris: Velocidade de animais Wistar e WAR. Mann Whitney. ** $p < 0,01$.

Tabela 11 – Comparação entre animais Wistar e WAR envelhecidos (17 meses de idade) durante o primeiro reteste (26ª tentativa). Valores obtidos através do teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Parâmetros	Média $\pm$ erro padrão		Comparação Wistar $\times$ WAR
	Wistar	WAR	
Latência (s)	18,03 $\pm$ 3,32	107 $\pm$ 30,68	**
Distância Calculada (cm)	307,7 $\pm$ 58,96	1446 $\pm$ 410,2	*
Velocidade (cm/s)	17,65 $\pm$ 0,77	13,45 $\pm$ 0,68	**

No segundo reteste ou 27ª tentativa, não houve diferença significativa entre as linhagens WAR e Wistar para os parâmetros latência (Figura 31) e distância calculada ($p > 0,05$; Figura

40]

Tabela 12 – Comparação entre animais *Wistar* e *WAR* envelhecidos (17 meses de idade) durante o segundo reteste (27ª tentativa). Valores obtidos através do teste de *Mann-Whitney* (ns $p>0,05$; ** $p<0,01$).

Parâmetros	Média ± erro padrão		Comparação <i>Wistar</i> x <i>WAR</i>
	<i>Wistar</i>	<i>WAR</i>	
Latência (s)	19,87±5,19	50,74±22,76	ns
Distância Calculada (cm)	411,2±84,14	858±372,1	ns
Velocidade (cm/s)	23,40±1,18	17,89±1,13	**

No terceiro ou último reteste (28ª tentativa), os animais *WAR* apresentaram maior latência (** $p<0,01$; Figura 34) em relação aos controles *Wistar*, mas não encontramos diferença entre as linhagens para o parâmetro distância calculada ($p>0,05$; Figura 35). Os animais *WAR* apresentaram menor velocidade de natação (** $p<0,01$; Figura 36) que os controles *Wistar*. As diferenças observadas entre as linhagens *WAR* e *Wistar* durante o terceiro reteste são melhores descritas na Tabela 13.

Figura 34 – Latência de animais *Wistar* e *WAR* durante o terceiro reteste. Navegação espacial de animais envelhecidos durante o reteste 3 (28ª tentativa) no Labirinto Aquático de Morris: Latência para encontrar a plataforma de animais *Wistar* e *WAR*. *Mann Whitney*. ** $p<0,01$.

Figura 35 – Distância Calculada de animais Wistar e WAR durante o terceiro reteste. Navegação espacial de animais envelhecidos durante o reteste 3 (28ª tentativa) no Labirinto Aquático de Morris: Distância Calculada de animais Wistar e WAR. Mann Whitney. $p>0,05$.

Figura 36 – Velocidade de animais Wistar e WAR durante o terceiro reteste. Navegação espacial de animais envelhecidos durante o reteste (28ª) no Labirinto Aquático de Morris: Velocidade de animais Wistar e WAR. Mann Whitney. $**p<0,01$.

Tabela 13 – Comparação entre animais Wistar, e WAR envelhecidos (17 meses de idade) durante o terceiro reteste (28ª tentativa). Valores obtidos através do teste de Mann-Whitney (ns $p>0,05$; $**p<0,01$).

Parâmetros	Média $\pm$ erro padrão		Comparação Wistar x WAR
	Wistar	WAR	
Latência (s)	21,82 $\pm$ 5,12	66,64 $\pm$ 20	**
Distância Calculada (cm)	484,4 $\pm$ 130,2	980,2 $\pm$ 320,9	ns
Velocidade (cm/s)	21,7 $\pm$ 1,37	14,24 $\pm$ 1,08	**

4.2. Análise dos biomarcadores da doença de Alzheimer

4.2.1. Análise da expressão da proteína tau fosforilada (pTau) em animais WAR

Para o grupo adulto, não encontramos diferença significativa nas análises de densitometria dos níveis de expressão de pTau, Tau total e relação pTau/Tau entre as linhagens WAR e Wistar, tanto no HV quanto no HD ($p > 0,05$ para todas comparações; Figura 37). Os valores encontrados são melhor descritos na Tabela 14.

Para o grupo envelhecido, observamos que, quando comparados aos controles Wistar, os animais WAR apresentaram aumento significativo nos níveis de expressão de pTau no HV ($**p < 0,01$) e HD ($*p < 0,05$). Não encontramos diferença significativa entre as linhagens WAR e Wistar nos níveis de tau total, tanto no HV, quanto no HD ($p > 0,05$ para ambos). Os animais WAR apresentaram aumento significativo na relação pTau/tau total no HV e no HD ($**p < 0,01$ para ambos; Figura 38). Esse aumento foi confirmado através de ensaios de imunofluorescência (Figura 39). Os valores foram normalizados pelos níveis de γ -tubulina. As diferenças observadas entre as linhagens WAR e Wistar após análise das proteínas pTau e tau são melhor descritas na tabela 15.

Figura 37 – Quantificação da expressão e níveis de fosforilação (S396) da proteína tau em animais WAR adultos. Utilizaram-se os anticorpos *Anti-Tau (phospho S396) antibody [EPR2731] (ab109390)* e *Anti-Tau antibody [E178] (ab32057)* para quantificação de proteínas em extratos de HV e HD de ratos adultos (4 meses). A: Imagem representativa da quantificação por *Western blotting* de 5-7 animais. B: Gráfico representativo da quantificação de pTau, em extratos de HV. C: Gráfico representativo da quantificação de pTau em extratos de HD. D: Gráfico representativo da quantificação de tau em extratos de HV. E: Gráfico representativo da quantificação de tau em extratos de HD. F: Gráfico representativo da relação pTau/tau em extratos de HV. G: Gráfico representativo da relação pTau/tau em extratos de HD. Valores normalizados pelo controle endógeno γ -tubulina (γ -tub). Teste *t* de *student*. $p > 0,05$.

Tabela 14 – Quantificação dos níveis da proteína Tau fosforilada (pTau), total (Tau) e relação pTau/tau por densitometria em extratos de hipocampo ventral (HV) e hipocampo dorsal (HD) de ratos adultos (4 meses). Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina e obtidos através do teste *t* de *student* (ns $p>0,05$).

Proteínas	Média±erro padrão				Comparações	
	<i>Wistar</i>		<i>WAR</i>		<i>Wistar</i> HV $\times$ <i>WAR</i> HV	<i>Wistar</i> HD $\times$ <i>WAR</i> HD
	HV	HD	HV	HD		
pTau	1,47±0,28	2,22±0,48	1,44±0,36	1,85±0,30	ns	ns
Tau total	1,42±0,13	1,41±0,10	1,42±0,13	1,43±0,12	ns	ns
pTau/Tau	0,98±0,11	1,48±0,21	0,94±0,11	1,33±0,21	ns	ns

Figura 38 – Quantificação da expressão e níveis de fosforilação (S396) da proteína tau em animais WAR envelhecidos. Utilizaram-se os anticorpos *Anti-Tau (phospho S396) antibody [EPR2731] (ab109390)* e *Anti-Tau antibody [E178] (ab32057)* para quantificação de proteínas em extratos de HV e HD de ratos envelhecidos (17 meses). A: Imagem representativa da quantificação por *Western blotting* de 5-7 animais. B: Gráfico representativo da quantificação de pTau, em extratos de HV. C: Gráfico representativo da quantificação de pTau em extratos de HD. D: Gráfico representativo da quantificação de tau em extratos de HV. E: Gráfico representativo da quantificação de tau em extratos de HD. F: Gráfico representativo da relação pTau/tau em extratos de HV. G: Gráfico representativo da relação pTau/tau em extratos de HD. Valores normalizados pelo controle endógeno γ -tubulina (γ -tub). Teste *t* de *student*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela 15 – Quantificação dos níveis da proteína Tau fosforilada (pTau), total (Tau) e relação pTau/Tau por densitometria em extratos de hipocampo ventral (HV) e hipocampo dorsal (HD) de ratos envelhecidos (17 meses). Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina e obtidos através do teste *t* de *student* (ns $p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Proteínas	Média±erro padrão				Comparações	
	Wistar		WAR		Wistar HV $\times$ WAR HV	Wistar HD $\times$ WAR HD
	HV	HD	HV	HD		
pTau	3,18±0,22	2,58±0,29	4,89±0,37	4,04±0,37	**	*
Tau total	3,89±0,21	5,53±0,46	4,7±0,53	4,78±0,44	ns	ns
pTau/Tau	0,78±0,03	0,51±0,04	1,07±0,08	0,86±0,08	**	**

Figura 39 – Imagens representativas da imunomarcção de tau fosforilada (pTau) em hipocampo de ratos envelhecidos. Imunofluorescência de cortes congelados de hipocampo de ratos *Wistar* e *WAR* envelhecidos (17 meses), marcados com anticorpo *Anti-Tau (phospho S396) antibody [EPR2731] (ab109390)*, revelados com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (vermelho). Os núcleos foram corados por DAPI (azul). As barras de escala correspondem a 100 μ m. Abaixo, a representação estereotóxica, com o ponto em vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia. GD: giro denteado.

4.2.2. Análise da expressão do peptídeo beta-amilóide em ratos WAR

Para o grupo adulto, os animais WAR apresentaram menores níveis de expressão do peptídeo A β que os controles *Wistar* em análises do HV (* $p < 0,05$), mas não encontramos diferença significativa entre as linhagens WAR e *Wistar* no HD ($p > 0,05$; Figura 40).

O anticorpo utilizado para análise da expressão de A β neste estudo reconhece uma proteína de 87 kDa. Entretanto, o peptídeo A β descrito na literatura apresenta peso molecular de aproximadamente 4 kDa (GLENNER; WONG, 1984; HAASS et al., 1992; SEUBERT et al., 1992; SHANKAR et al., 2008). Sendo assim, é possível que fragmentos de APP tenham sido reconhecidos nas análises. A diferença e valores encontrados são melhor descritos na Tabela 16.

Figura 40 – Quantificação do peptídeo beta-amilóide (A β) em ratos WAR adultos. Utilizou-se o anticorpo *Anti-beta Amyloid antibody ab216436* para quantificação do peptídeo A β em extratos de hipocampo de ratos adultos (4 meses). A: Imagem representativa da quantificação por *Western blotting* de 5-7 animais. B: Gráfico representativo da quantificação de A β em extratos de hipocampo ventral (HV). C: Gráfico representativo da quantificação de A β em extratos de HD. Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina (γ -tub). Teste *t* de *student*. * $p < 0,05$.

Tabela 16 – Quantificação dos níveis do peptídeo beta-amiloide (A β) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos adultos (4 meses). Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina e obtidos através do teste *t* de *student* (ns $p>0,05$; * $p<0,05$).

Peptídeo	Média $\pm$ erro padrão				Comparações	
	Wistar		WAR		Wistar HV $\times$ WAR HV	Wistar HD $\times$ WAR HD
	HV	HD	HV	HD		
A β	0,80 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,03	*	ns

Para o grupo envelhecido, os animais WAR também apresentaram menores níveis de expressão do peptídeo A β que os controles Wistar no HV (* $p<0,05$), mas também não encontramos diferença significativa entre as linhagens WAR e Wistar no HD ($p>0,05$; Figura 41). Nas análises qualitativas realizadas por ensaios de imunofluorescência, os animais WAR apresentaram maior expressão de A β , como pode ser observado na Figura 42. A diferença e valores encontrados são melhor descritos na Tabela 17.

Figura 41 – Quantificação do peptídeo beta-amiloide (A β) em ratos WAR envelhecidos. Utilizou-se o anticorpo *Anti-beta Amyloid antibody ab216436* para quantificação do peptídeo A β em extratos de hipocampo de ratos adultos (4 meses). A: Imagem representativa da quantificação por *Western blotting* de 5-7 animais. B: Gráfico representativo da quantificação de A β em extratos de hipocampo ventral (HV). C: Gráfico representativo da quantificação de A β em extratos de HD. Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina (γ -tub). Teste *t* de *student*. * $p<0,05$.

Tabela 17 – Quantificação dos níveis do peptídeo beta-amilóide (A β) por densitometria em extratos de hipocampo ventral (HV) e hipocampo dorsal (HD) de ratos envelhecidos (17 meses). Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina e obtidos através do teste *t* de student (ns $p>0,05$; * $p<0,05$).

Peptídeo	Média $\pm$ erro padrão				Comparações	
	Wistar		WAR		Wistar HV $\times$ WAR HV	Wistar HD $\times$ WAR HD
	HV	HD	HV	HD		
A β	0,36 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	*	ns

Figura 42 – Imagens representativas da imunomarcagem de beta-amilóide (A β) em hipocampo de ratos envelhecidos. Imunofluorescência de cortes congelados de hipocampo de ratos Wistar e WAR envelhecidos (17 meses), marcados com anticorpo Anti-beta Amyloid antibody ab216436, revelados com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (em vermelho). Os núcleos foram corados por DAPI (azul). As barras de escala correspondem a 100 μ m. Abaixo, a representação estereotáxica, com o ponto em vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia. GD: giro denteado.

4.3. Análise da regulação da via de sinalização de insulina

4.3.1. Análise da expressão do receptor de insulina (IR) em animais WAR

No grupo adulto, os animais WAR apresentaram menor expressão de IR que os controles Wistar, no HV (* $p < 0,05$), mas não encontramos diferença significativa entre as linhagens WAR e Wistar no HD ($p > 0,05$; Figura 43). A diferença e valores encontrados são melhor descritos na Tabela 18.

Figura 43 – Quantificação da subunidade β do receptor de insulina (IR) em ratos WAR adultos.

Utilizou-se o anticorpo *Insulin Rβ Antibody (C-19): sc-711* para quantificação da expressão do receptor de insulina (IR) em extratos de hipocampo de ratos adultos (4 meses). A: Imagem representativa da quantificação por *Western blotting* de 5-7 animais. B: Gráfico representativo da quantificação de IR em extratos de HV. C: Gráfico representativo da quantificação de IR em extratos de HD. Valores normalizados pelos níveis de γ-tubulina (γ-tub). Teste t de *student*. * $p < 0,05$.

Tabela 18 – Quantificação da expressão do receptor de insulina (IR) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos adultos (4 meses). Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina e obtidos através do teste *t* de *student* (ns $p>0,05$; * $p<0,05$).

Proteína	Média±erro padrão				Comparações	
	Wistar		WAR		Wistar HV $\times$ WAR HV	Wistar HD $\times$ WAR HD
	HV	HD	HV	HD		
IR	0,54±0,03	0,41±0,01	0,43±0,02	0,46±0,04	*	ns

No grupo envelhecido, os animais WAR também apresentaram menores níveis de expressão de IR no HV (* $p<0,05$) e não houve diferença significativa entre as linhagens WAR e Wistar em análises do HD ($p>0,05$; Figura 44). Os ensaios por imunofluorescência demonstraram menor expressão de IR no hipocampo de animais WAR comparados aos Wistar (Figura 45). A diferença e valores encontrados são melhor descritos na Tabela 19.

Figura 44 – Quantificação da subunidade β do receptor de insulina (IR) em ratos WAR envelhecidos. Utilizou-se o anticorpo *Insulin R β Antibody (C-19): sc-711* para quantificação da expressão do receptor de insulina (IR) em extratos de hipocampo de ratos adultos (4 meses). A: Imagem representativa da quantificação por *Western blotting* de 5-7 animais. B: Gráfico representativo da quantificação de IR em extratos de HV. C: Gráfico representativo da quantificação de IR em extratos de HD. Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina (γ -tub). Teste *t* de *student*. * $p<0,05$.

Tabela 19 – Quantificação da expressão do receptor de insulina (IR) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos envelhecidos (14 meses). Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina e obtidos através do teste t de *student* (ns $p>0,05$; $*p<0,05$).

Proteína	Média $\pm$ erro padrão				Comparações	
	Wistar		WAR		Wistar HV $\times$ WAR HV	Wistar HD $\times$ WAR HD
	HV	HD	HV	HD		
IR	1,30 $\pm$ 0,13	1,79 $\pm$ 0,1	0,91 $\pm$ 0,09	1,77 $\pm$ 0,14	*	ns

Figura 45 – Imagens representativas da imunomarcagem da subunidade β do receptor de insulina (IR) em ratos WAR envelhecidos. Imunofluorescência de cortes congelados de hipocampo de ratos Wistar e WAR envelhecidos (17 meses), marcados com anticorpo *Insulin R β Antibody (C-19): sc-711*, revelados com anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (em vermelho). Os núcleos foram corados por DAPI (azul). As barras de escala correspondem a 100 μ m. Abaixo, a representação estereotática, com o ponto em vermelho indicando a região observada nas imagens de microscopia.

4.3.2. Análise da expressão do substrato do receptor de insulina-1 fosforilado (S312) em animais WAR

Animais WAR machos adultos com 4 meses de idade (não submetidos ao LAM) apresentaram maior número de células positivas para *Phospho-IRS1* (S312), quando comparados aos controles *Wistar* (** $p < 0,01$; Figura 46). A análise qualitativa realizada por ensaios de imunofluorescência corrobora esses dados (Figura 47). A diferença encontrada é melhor descrita na Tabela 22.

Figura 46 – Quantificação do número de células positivas para o substrato do receptor de insulina 1 fosforilado em serina 312 (pIRS-1 S312) por imunohistoquímica (DAB) em animais WAR adultos. Cortes congelados de hipocampo (40 μm) de ratos *Wistar* e *WAR* adultos (4 meses) foram utilizados para análises por imunohistoquímica (DAB) do número de células positivas para pIRS-1 (S312) com o anticorpo *Phospho-IRS1* (S312) Antibody (Cusabio®). A: Imagem representativa de cortes do hipocampo de animais *Wistar* utilizada para análises quantitativas. B: Imagem representativa de cortes do hipocampo de animais *WAR* utilizada para análises quantitativas. C: Gráfico representativo da quantificação de células positivas para pIRS-1 (S312) em cortes congelados de hipocampo. Teste *t* de student. * $p < 0,05$.

Tabela 20 – Quantificação de células positivas para pIRS-1 S312 por imunistoquímica (DAB) em cortes congelados de hipocampo (40 µm) de ratos *Wistar* e *WAR* adultos (4 meses). Valores obtidos através do teste *t* de *student* (** $p < 0,01$).

Proteína	Média±erro padrão		Comparação
	<i>Wistar</i>	<i>WAR</i>	<i>Wistar</i> x <i>War</i>
pIRS-1 (S312)	14,98±4,93	36,14±2,6	**

4.3.3. Análise da expressão da glicogênio sintase quinase 3 alfa e beta fosforiladas em animais WAR

No grupo adulto, não houve diferença significativa entre as linhagens WAR e Wistar no HV ($p>0,05$). Entretanto, os animais WAR apresentaram maior expressão de pGSK-3 α/β (S21/9) no HD ($*p<0,05$; Figura 48). A diferença e valores encontrados são melhor descritos na Tabela 21.

Figura 48 – Quantificação da glicogênio sintase quinase 3 alfa e beta fosforiladas (pGSK-3 α/β) em ratos WAR adultos. Utilizou-se o anticorpo *Phosphor-GSK-3 α/β (Ser21/9) Antibody #9331* para quantificação da glicogênio sintase quinase 3 alfa e beta fosforiladas (pGSK-3 α/β S21/9) em extratos de hipocampo de ratos adultos (4 meses). A: Imagem representativa da quantificação por *Western blotting* de 5-7 animais. B: Gráfico representativo da quantificação de pGSK-3 α/β (S21/9) em extratos de HV. C: Gráfico representativo da quantificação de pGSK-3 α/β (S21/9) em extratos de hipocampo dorsal HD. Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina (γ -tub). Teste t de *student*. $*p<0,05$.

Tabela 21 – Quantificação da expressão da glicogênio sintase quinase 3 fosforilada α e β (pGSK-3 α/β S21/9) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos adultos (4 meses). Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina e obtidos através do teste t de *student* (ns $p>0,05$; * $p<0,05$).

Proteína	Média±erro padrão				Comparações	
	Wistar		WAR		Wistar HV x WAR HV	Wistar HD x WAR HD
	HV	HD	HV	HD		
pGSK-3 α/β (S21/9)	0,25±0,02	0,45±0,02	0,28±0,02	0,59±0,05	ns	*

No grupo envelhecido, os animais WAR apresentaram maior expressão de pGSK-3 α/β (S21/9) em análises de HV e HD (* $p<0,05$ para ambos; Figura 49). As diferenças e valores encontrados são melhor descritos na Tabela 22.

Figura 49 – Quantificação da glicogênio sintase quinase 3 alfa e beta fosforiladas (pGSK-3 α/β S21/9) em ratos WAR envelhecidos. Utilizou-se o anticorpo *Phosphor-GSK-3 α/β (Ser21/9) Antibody #9331* para quantificação da glicogênio sintase quinase 3 alfa e beta fosforiladas (pGSK-3 α/β S21/9) em extratos de hipocampo de ratos adultos (4 meses). A: Imagem representativa da quantificação por *western blotting* de 5-7 animais. B: Gráfico representativo da quantificação de pGSK-3 α/β (S21/9) em extratos de HV. C: Gráfico representativo da quantificação de pGSK-3 α/β em extratos de HD. Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina (γ -tub). Teste t de *student*. * $p<0,05$.

Tabela 22 – Quantificação da expressão da Glicogênio Sintase Quinase 3 fosforilada α e β (pGSK-3 α/β) por densitometria em extratos de HV e HD de ratos envelhecidos (17 meses). Valores normalizados pelos níveis de γ -tubulina e obtidos através do teste t de *student* (* $p<0,05$).

Proteína	Média±erro padrão				Comparações	
	<i>Wistar</i>		<i>WAR</i>		<i>Wistar</i> HV $\times$ WAR HV	<i>Wistar</i> HD $\times$ WAR HD
	HV	HD	HV	HD		
pGSK-3 α/β (S21/9)	0,59±0,09	0,78±0,07	1,08±0,12	1,65±0,34	*	*

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigou-se a linhagem *WAR* como um possível modelo para estudar a doença de Alzheimer relacionada com alterações na regulação da via de sinalização da insulina. O objetivo inicial deste estudo era comparar as linhagens *WAR* e *Wistar*. Embora a linhagem *Wistar* seja o controle original dos animais *WAR*, o Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e que fornece animais a todas as Faculdades, inclusive à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, passou por um processo de transição durante o período de execução deste estudo, substituindo os animais *Wistar* (conhecidos como *Wistar “Ribeirão”*), por animais *Wistar Hannover*. Sendo assim, decidimos incluir um novo grupo com animais *Wistar Hannover* para comparações na idade adulta. Não foram realizadas comparações entre as três linhagens para o grupo envelhecido devido à demanda de tempo para envelhecimento da nova linhagem.

Na análise dos dados comportamentais, não observamos diferença significativa entre as linhagens *WAR* e *Wistar Hannover* para nenhum dos parâmetros selecionados (latência, distância calculada e velocidade). Entretanto, encontramos diferenças significativas entre as linhagens *Wistar* e *Wistar Hannover* para todos os parâmetros comportamentais utilizados neste estudo. Sendo assim, é possível concluir que a linhagem *Wistar Hannover*, que ainda está passando por um processo de caracterização e padronização, não pode ser considerada controle neste estudo. Embora tenham sido descritas neste estudo, as diferenças entre as linhagens *Wistar* e *Wistar Hannover* não serão discutidas nessa sessão por não fazerem parte do propósito deste trabalho.

O LAM é um teste bastante utilizado para a validação de modelos animais no estudo da DA (SUN *et al.*, 2006; QING *et al.*, 2008; BROMLEY-BRITS; DENG; SONG, 2011). Como citado, neste estudo, realizaram-se 24 tentativas (4 sessões) durante o período de treinamento,

uma *Probe Trial* (25ª tentativa), um reteste imediatamente após a *Probe Trial* para avaliação da memória de curto prazo (26ª tentativa), e outros dois retestes para avaliação da memória de longo prazo, 24 horas e uma semana após a *Probe Trial* (27ª tentativa e 28ª tentativa) (GOELET *et al.*, 1986; DAVIS; SQUIRE, 1984; EBBINGHAUS, 2013).

De acordo com Morris (1984), ratos sem alterações cognitivas tendem a aprender rapidamente o encontro da plataforma de fuga, percorrendo o menor trajeto ao longo das tentativas (distância calculada) em um menor período de tempo (latência). Os dados comportamentais obtidos no presente estudo sugerem que a linhagem *WAR* apresenta alterações de aprendizado e memória espacial de curto e longo prazo no LAM em ambas as idades (adulto e envelhecido). Embora os animais *WAR* aprendam a tarefa (encontrar a plataforma de fuga) e apresentem diminuição da latência ao longo das tentativas, eles apresentam pior performance durante o período de aprendizagem e pior desempenho na maioria dos retestes, quando comparados aos seus controles *Wistar*. Outros estudos também demonstraram que animais transgênicos utilizados para estudar a DA apresentam maior latência de fuga no LAM (YAMAGUCHI *et al.*, 1991; JANUS *et al.*, 2000; CHISHTI *et al.*, 2001).

Além da latência de fuga, os parâmetros distância calculada e velocidade também são importantes para a representação da performance cognitiva dos animais no LAM (LINDNER, 1997). Deficiências na atividade locomotora, por exemplo, podem ser identificadas pela diferença de velocidade de natação entre os grupos estudados (VORHEES; WILLIAMS, 2006). Neste estudo, embora os *WARs* adultos e envelhecidos tenham apresentado maior latência, esses animais apresentaram menor velocidade de natação que os controles *Wistar* durante tentativas do período de treinamento e retestes.

É importante observar que a menor velocidade de natação dos animais *WAR* também ocorre durante a *Probe Trial*. Durante essa tentativa, a plataforma é removida e a acurácia

espacial do animal pode ser demonstrada pelo tempo em que ele permanece à procura da plataforma no quadrante alvo (quadrante onde se posicionava a plataforma de fuga). Animais cognitivamente saudáveis tendem a explorar mais o quadrante alvo, permanecendo aproximadamente 50% do tempo de natação neste espaço (D'HOOGE; DEYN, 2001). No presente estudo, a ocupação do quadrante alvo durante os 60 segundos da *Probe Trial* foi similar entre as duas linhagens, entretanto, os animais *WAR* apresentaram menor distância calculada e menor velocidade de natação do que os *Wistars*. As variáveis observadas nessa tentativa poderiam ser sugestivas de alteração de atividade locomotora nos animais *WAR* e influenciar na interpretação do parâmetro latência.

Por outro lado, Fitzgerald e Dokla (1989) demonstraram que alterações de memória e aprendizado observadas no LAM são independentes de efeitos locomotores. Além disso, Yamaguchi e colaboradores (1991) também observaram dados sugestivos de alterações motoras em modelos transgênicos de DA, entretanto, os autores sugerem que deficiências na natação só devem ser consideradas se os animais apresentam velocidade de natação diminuída em todas as tentativas. Neste estudo, os animais *WAR* adultos apresentaram menor velocidade de natação durante as tentativas 11, 17, 18, 23, 24, 25, 26, 27 e 28. Enquanto que, para o grupo envelhecido, o teste estatístico utilizado (*Bonferroni*) não foi sensível o suficiente para identificar individualmente tentativas significativamente diferentes.

É possível observar também que, para o grupo adulto, a velocidade de natação dos animais da linhagem *WAR* é semelhante à velocidade de natação dos animais *Wistar* nas sessões 1 e 2, com exceção da tentativa 11. Apenas no final das sessões 3 e 4, os *WARs* começam a apresentar velocidades constantemente menores que os *Wistars*, sugerindo possíveis alterações na persistência, as quais poderiam estar relacionadas a comportamentos de ansiedade e depressão. Nesse contexto, Castro e colaboradores (2017) submeteram animais *WAR* ao teste

do nado forçado, um teste utilizado para avaliar alterações comportamentais após exposição à situação estressante inescapável, e observaram que, embora esses animais não apresentem alterações motoras, os *WARs* apresentam menor latência e maior tempo de imobilidade, sugerindo possível comportamento do tipo-depressivo. Além disso, já foi demonstrado que animais da linhagem *WAR* são endogenamente ansiosos (GARCIA-CAIRASCO *et al.*, 1998). Neste sentido, a depressão já foi descrita como comorbidade associada à DA por diversos autores (ROVNER *et al.*, 1989; ALEXOPOULOS; ABRAMS, 1991; LYKETSOS; OLIN, 2002; CHI *et al.*, 2015; STECK; COOPER; ORGETA, 2018).

Embora fatores ambientais, como temperatura, luz e ruído tenham sido monitorados e padronizados ao longo do teste, o LAM por si só pode ter sido um evento estressante, resultando, possivelmente, em alterações comportamentais e, conseqüentemente, alterando a velocidade de natação dos *WARs*. Por outro lado, os animais *WAR* adultos apresentaram latência de fuga significativamente maior que os controles *Wistar* em tentativas em que não foram observadas diferenças na velocidade de natação entre as linhagens (tentativas 8, 9, 12, 19, 20 e 21). Sendo assim, a maior latência de fuga, maior distância calculada e menor velocidade de natação de animais *WAR* observadas ao longo das tentativas no LAM sugerem menor precisão de navegação, e não deficiência locomotora.

Já foi demonstrado que modelos transgênicos utilizados para estudar a DA geralmente começam a apresentar alterações na memória e aprendizado próximo aos 9 meses de idade e que essa deficiência cognitiva é frequentemente acompanhada pelo aumento na expressão de A β e formação de placas senis (HSIAO *et al.*, 1996). No presente estudo, observou-se que animais *WAR* com 4 meses de idade já apresentavam alterações significativas no aprendizado e memória espacial. Estudos ainda não publicados realizados em nosso laboratório

demonstraram que animais WAR com 2 meses de idade já apresentavam sinais sutis de alteração de memória no LAM (VILELLA *et al.*, 2016).

Neste estudo, realizou-se a quantificação do peptídeo A β em extratos de hipocampo de ratos WAR e *Wistar* (adultos e envelhecidos) com a finalidade de correlacionar alterações comportamentais com a expressão desse peptídeo. É importante ressaltar que o peptídeo A β é um fragmento derivado do processo enzimático responsável pelo metabolismo da APP (~110-135 kDa) (SELKOE *et al.*, 1988) e apresenta baixo peso molecular. Em sua fase inicial, o A β apresenta espécie monomérica, com peso molecular de aproximadamente 4 kDa (GLENNER; WONG, 1984; HAASS *et al.*, 1992; SEUBERT *et al.*, 1992; SHANKAR *et al.*, 2008).

Devido ao fato de que grande parte dos estudos realizados com DA atualmente utilizam modelos transgênicos que expressam A β humana (DRUMMOND; WISNIEWSKI, 2017), a comercialização de anticorpos para A β endógena de roedores é bastante limitada. Para a realização deste estudo, após vasta procura, optou-se pela utilização do anticorpo *anti-beta amyloid (ab216436)*. Entretanto, encontramos dificuldades na interpretação dos resultados, uma vez que esse anticorpo reconhece um peptídeo A β de 87 kDa. Nos resultados obtidos através de *Western blotting*, os animais WAR adultos e envelhecidos apresentam diminuição na expressão dessa proteína de 87 kDa no hipocampo ventral quando comparados aos controles *Wistar*. Entretanto, em análises qualitativas de ensaios por imunofluorescência utilizando o mesmo anticorpo, o hipocampo de animais WAR envelhecidos apresenta maior expressão de A β , especialmente em hilus e CA3.

A seletividade do anticorpo utilizado pode ter sido diferente nas duas técnicas devido à especificidade do *Western blotting* por proteínas intermediárias do processo de clivagem da APP, em especial um possível produto de 87 kDa. Considerando o peso molecular do A β reconhecido nas análises por *Western blotting* do presente estudo e o baixo peso molecular do

peptídeo A β descrito na literatura, uma possível explicação seria o reconhecimento de uma sequência de resíduos também presente na APP ou em algum fragmento precursor de A β (APP clivada). Como a APP apresenta um peso molecular de aproximadamente 110-135 kDa (SELKOE *et al.*, 1988), ela não poderia ter sido reconhecida nessa análise. Por outro lado, um fragmento derivado da APP, mas anterior às clivagens que liberam o A β no meio extracelular, pode ter sido reconhecido. Dessa forma, a redução desse fragmento precursor de A β identificada nas análises por *Western blotting* poderia ser sugestiva de aumento de sua clivagem e, conseqüentemente, de aumento na produção de A β , corroborando os dados comportamentais e aumento de expressão de A β identificados por ensaios de imunofluorescência. Para confirmação dessa hipótese, pretende-se realizar uma análise quantitativa das imagens dos ensaios por imunofluorescência.

Além do peptídeo A β , a proteína pTau também está relacionada com alterações cognitivas em pacientes (ARRIAGADA *et al.*, 1992) e modelos animais para DA (SANTACRUZ *et al.*, 2005). De acordo com a hipótese da “cascata amilóide”, o aumento da produção de A β precede a formação de emaranhados neurofibrilares resultantes da hiperfosforilação de tau. O peptídeo A β interfere negativamente na homeostasia de cálcio e é capaz de aumentar sua concentração intracelular, promovendo, assim, a hiperfosforilação de tau (HARDY; HIGGINS, 1992).

Neste estudo, embora ambas as idades tenham apresentado alterações comportamentais, apenas os animais WAR envelhecidos apresentaram aumento de pTau ventral e dorsal, evidenciando a progressão da doença. Se os dados do ensaio de imunofluorescência que sugerem aumento na expressão de A β no hipocampo ventral de ratos forem confirmados, as alterações identificadas neste estudo podem contribuir para a confirmação da hipótese da “cascata amiloide”. Estudos já demonstraram que a infusão de A β é suficiente para gerar

alterações de memória (FLOOD; MORLEY; ROBERTS, 1991) e hiperfosforilação anormal da proteína tau (ZHENG *et al.*, 2002; BOLMONT *et al.*, 2007). Dessa forma, os dados encontrados podem sugerir que os animais WAR apresentam inicialmente deficiência na memória devido a alterações no processo de metabolismo de APP, com consequente aumento na produção de A β , progredindo para hiperfosforilação anormal da proteína tau nos hipocampus dorsal e ventral ao longo do processo de envelhecimento.

Uma vez constatadas as alterações comportamentais e moleculares características da DA na linhagem WAR, buscou-se identificar possíveis mecanismos que contribuiriam com essas alterações observadas. Estudos recentes têm sugerido que a DA seja um terceiro tipo de diabetes devido a alterações na via de sinalização da insulina (KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2016; LESZEK *et al.*, 2017; PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2017; DE LA MONTE; TONG; WANDS, 2018; ARNOLD *et al.*, 2018). Além disso, estudos prévios com WARs já haviam demonstrado que esses animais apresentam alterações endócrinas e metabólicas (BOTION; DORETTO, 2003; PEREIRA *et al.*, 2008; UMEOKA *et al.*, 2011). Sendo assim, decidiu-se caracterizar a via de sinalização da insulina em hipocampo de animais WAR e correlacionar com os fenótipos característicos da DA apresentados por essa linhagem.

A proteína tau também é expressa em células pancreáticas e sua fosforilação é capaz de influenciar no tráfico e liberação de insulina (MAJ *et al.*, 2016). Marciniak e colaboradores (2017) demonstraram recentemente que a deleção do gene da proteína tau em tecido pancreático promove alterações na via de sinalização da insulina no hipocampo, sugerindo um efeito bidirecional entre resistência à insulina e hiperfosforilação de tau.

Realizou-se, portanto, a investigação de possíveis alterações na expressão de proteínas importantes para a via de resistência à insulina, iniciando com a quantificação da expressão dos receptores de insulina por *Western blotting*. Os IRs são altamente expressos em todos os tipos

de células do SNC, entretanto, a expressão desse receptor pode ser mais significativa em determinadas regiões do cérebro. O hipocampo é uma das regiões que mais expressam IR (WERTHER *et al.*, 1987). Neste estudo, tanto os animais WAR adultos quanto WAR envelhecidos apresentaram diminuição na expressão de IR no HV, mas não no HD, quando comparados aos controles Wistar. Frolich e colaboradores (2011) encontraram uma diminuição na expressão de IR em cérebro de indivíduos com DA. De acordo com Leszek e colaboradores (2017), essa diminuição pode resultar em resistência central à insulina, alterando o metabolismo do SNC e, conseqüentemente, afetando a função cognitiva.

Embora a maioria dos estudos têm demonstrado que o HD está mais relacionado com funções cognitivas e que o HV seria responsável pela modulação de comportamentos relacionados à ansiedade, existem evidências de que o HV também participa do processo de aprendizagem espacial (STRANGE *et al.*, 2014; HUCKLEBERRY *et al.*, 2018). Além disso, Sadia e colaboradores (2017) demonstraram recentemente que a inativação do hipocampo ventral, mas não do hipocampo dorsal, prejudica a expressão e reaquisição da memória de recompensa em ratos.

A fosforilação anormal de IRS-1 em serinas é um dos eventos desencadeantes de resistência à insulina e já foi descrita no hipocampo de indivíduos e modelos animais com DA (TALBOT *et al.*, 2012). Yarchoan e colaboradores (2014) demonstraram que a fosforilação anormal de IRS-1 em S616 e S312 é extremamente elevada na DA e parece estar relacionada com hiperfosforilação de tau. No presente estudo, os níveis de fosforilação de IRS-1 em S312 foram quantificados através de imunoistoquímica em animais WAR e *Wistar naïve* adultos. Os animais WAR apresentaram maiores níveis de pIRS-1 (S312) no hipocampo, quando comparados aos seus controles *Wistar*, sugerindo, portanto, resistência central à insulina.

Bomfim e colaboradores (2012) mostraram que o tratamento com A β Os é capaz de promover a fosforilação de IRS-1 em serinas em cérebros de camundongos. Além disso, endossomos do plasma de indivíduos com DA apresentam níveis elevados de pIRS-1 em serina e redução de fosforilação desse substrato em tirosina. Essas alterações podem estar relacionadas com atrofia cerebral apresentada por esses pacientes (MULLINS *et al.*, 2017). Lee e colaboradores (2018) demonstraram recentemente que os animais WAR apresentam alterações volumétricas de hipocampo e outras regiões límbicas.

A fosforilação em tirosinas da IRS resulta na ativação da via de sinalização da Akt. A Akt, por sua vez, inibe a atividade da GSK-3 através de sua fosforilação. Sendo assim, procedemos com a quantificação de pGSK-3 α/β por *Western blotting*. Os animais WAR adultos apresentaram aumento da expressão de pGSK-3 α/β no hipocampo dorsal em relação aos controles Wistar. Os WARs envelhecidos apresentaram maiores níveis de pGSK-3 α/β nos hipocampus dorsal e ventral quando comparados aos *Wistars*. Embora alguns estudos tenham demonstrado que GSK-3 em sua forma ativa está relacionado à hiperfosforilação da proteína tau na DA (YAMAGUCHI *et al.*, 1996; PEI *et al.*, 1999), os dados obtidos neste estudo indicam que a linhagem WAR apresenta aumento da expressão da GSK-3 em sua forma inativa (fosforilada), o que contradiz com a hiperfosforilação anormal da proteína tau identificada nesses animais envelhecidos.

Embora a redução de pGSK-3 já tenha sido descrita na DA (STEEN *et al.*, 2005; TAKASHIMA, 2006; LIU *et al.*, 2011), outros estudos corroboram nossos achados, pois identificaram aumento da fosforilação de GSK-3 em cérebros *post-mortem* de indivíduos com DA (PEI *et al.*, 2003; GRIFFIN *et al.*, 2005). Dessa forma, uma possível interpretação dos dados obtidos neste estudo seria a existência de um mecanismo compensatório na linhagem WAR no qual o aumento excessivo da proteína pTau resultaria no aumento da fosforilação

da GSK-3 em uma tentativa de inibir sua atividade exacerbada. Esse mecanismo seria eficiente em animais adultos, onde não se encontra diferença nos níveis de pTau, mas não mais em animais envelhecidos, que apresentam aumento na expressão não só de pGSK-3 α/β , mas também de pTau nos hipocampus dorsal e ventral.

Swatton e colaboradores (2004) também encontraram aumento da inibição de GSK-3 α/β em cérebros *post-mortem* de indivíduos com DA e de indivíduos com síndrome de Down. É importante ressaltar que pacientes com síndrome de Down geralmente apresentam alterações características de DA precocemente (RUMBLE *et al.*, 1989; HANDEN *et al.*, 2012). Portanto, ainda não há um consenso sobre a participação da GSK-3 na DA.

Estudos já demonstraram que modelos animais de DMT2 apresentam alterações de memória (LI *et al.*, 2002; WINOCUR *et al.*, 2005). Além disso, injeções intracerebrais de estreptozotocina, uma glicosamina-nitrosureia que destrói as células beta pancreáticas e induz diabetes, promovem alterações características de DA e têm sido utilizadas para estudar essa doença (LANNERT; HOYWER, 1998). Schubert e colaboradores (2004) realizaram uma análise detalhada do processo de aprendizado no LAM e de proteínas da via de sinalização de insulina em camundongos com inativação condicional do gene do IR no SNC. Os autores encontraram redução na fosforilação da Akt e GSK-3 e aumento da fosforilação da proteína tau. Entretanto, essas alterações não foram suficientes para promover alterações de memória e aprendizado no LAM. Dessa forma, a diminuição da expressão de IR e a hiperfosforilação anormal da proteína tau observadas no hipocampo de ratos WAR podem não ser suficientes para gerar danos cognitivos, mas, quando associadas a outros agentes, como o possível aumento da clivagem de APP e formação excessiva do peptídeo A β , podem resultar em alterações significativas de memória e aprendizado, como as alterações observadas neste estudo através do LAM.

Com o intuito de analisar a relação entre DA e diabetes, durante a execução deste estudo, também idealizamos investigar a influência de A β na regulação da via de sinalização de insulina. Os detalhes experimentais da injeção e quantificação dos A β Os estão descritos na sessão de metodologia.

Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com veículo e tratados com A β O no teste de reconhecimento de objetos. No LAM, os animais *Wistar* tratados com veículo apresentaram menor latência para encontrar a plataforma apenas no reteste 2, realizado 24 horas após a *Probe Trial*, sem diferenças durante o período de treinamento ou demais retestes para todos os parâmetros. Não houve diferença entre os animais *WAR* tratados com veículo e *WAR* tratados com A β Os no LAM (dados não apresentados).

Estudos já demonstraram que a injeção de A β O em cérebro de ratos promove alterações de memória e alguns autores têm utilizado a inoculação de A β O para induzir modelos para o estudo da DA (BAE *et al.*, 2012; ZUSSY *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2012 XU *et al.*, 2014; RAMMES *et al.*, 2015; JIA *et al.*, 2016; WONG; CECETTO; WHITEHEAD, 2016; ZHANG *et al.*, 2016; AMIRI *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018). Portanto, os dados comportamentais encontrados não corroboram os dados descritos na literatura.

Apesar da soma de esforços, ao fim, este protocolo não se mostrou viável nas condições experimentais realizadas. E, portanto, optamos por não descrever os resultados neste trabalho. Como os dados obtidos não corroboravam os dados descritos na literatura e não havia tempo e recursos suficientes para aquisição de um novo A β humano sintético produzido por outro fabricante, optou-se por caracterizar a via de sinalização de insulina e analisar possíveis alterações na expressão de A β e tau fosforilada em animais da linhagem *WAR*, que ao fim se mostrou como uma boa escolha com relevantes achados aqui descritos.

6. CONCLUSÃO

Nossos achados indicam aumento anormal da proteína tau fosforilada (S396) em animais *WAR* envelhecidos, associado ao pior desempenho no LAM para ambas as idades. Além disso, nossos achados são sugestivos de possíveis alterações na via de sinalização da insulina no hipocampo de animais *WAR*, identificadas através da redução da expressão de RI, aumento do número de células positivas para pIRS-1 (S312) e aumento da expressão de pGSK-3 α/β (S21/9). Embora inconclusivos, os dados até agora obtidos sugerem menores níveis de um possível precursor de A β no HV em ambas as idades e consequente aumento na clivagem de APP, quando comparados ao controle *Wistar*.

Consequentemente, apesar de os animais *WAR* terem sido selecionados inicialmente como modelo experimental genético para estudar epilepsia, nossos achados sugerem a coexistência de alterações comportamentais e moleculares características de DA e resistência central à insulina, podendo se somar ao fenótipo inicialmente selecionado. Portanto, outros estudos moleculares e histológicos são necessários para melhor compreensão dos dados encontrados e para possível validação da linhagem *WAR* como um modelo para estudar a relação entre DA e resistência central à insulina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTER, K. et al. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: Shared pathology and treatment? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 365–376, 2011.

ALEXOPOULOS, George S.; ABRAMS, Robert C. Depression in Alzheimer's disease. **Psychiatric Clinics**, v. 14, n. 2, p. 327-340, 1991.

ALONSO, Alejandra del C. et al. Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 23, p. 8864-8869, 2006.

ALZHEIMER ASSOCIATION. 2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia** 2016, v. 12, n. 4, p. 1–80, 2016.

ALZHEIMER, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. **Allg. Z. Psychiatr.**, v. 64, p. 146-148, 1907.

Alzheimer's association et al. 2018 alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & dementia**, v. 14, n. 3, p. 367-429, 2018.

AMIRI, Sara et al. Time dependent injection of β -Amyloid maintenance effect in CA1 region of hippocampus on learning and spatial memory. **KAUMS Journal (FEYZ)**, v. 22, n. 1, p. 0-0, 2018.

ANISMAN, H.; MCINTYRE, D. C. Conceptual , Spatial , and Cue Learning in the Morris Water Maze in Fast or Slow Kindling Rats : **Attention Deficit Comorbidity**. v. 22, n. 17, p. 7809–7817, 2002.

ARAKI, Eiichi et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186, 1994.

ARNOLD, Steven E. et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 3, p. 168, 2018.

ARRIAGADA, Paulina V. et al. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 42, n. 3, p. 631-631, 1992.

BAE, Donghyuck et al. Inhaled essential oil from *Chamaecyparis obtuse* ameliorates the impairments of cognitive function induced by injection of β -amyloid in rats. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 7, p. 900-910, 2012.

BAGLIETTO-VARGAS, David et al. Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 64, p. 272-287, 2016.

BANIK, Avijit et al. Translation of Pre-Clinical Studies into Successful Clinical Trials for Alzheimer's Disease: What are the Roadblocks and How Can They Be Overcome? 1. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 47, n. 4, p. 815-843, 2015.

BANKS, William A. et al. Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. **Peptides**, v. 18, n. 9, p. 1423-1429, 1997.

BAURA, Gail D. et al. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 4, p. 1824-1830, 1993.

BEAR, Mark F.; CONNORS, Barry W.; PARADISO, Michael A. (Ed.). **Neuroscience**. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

BEERI, Michal Schnaider et al. Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. **Mechanisms of ageing and development**, v. 132, n. 11-12, p. 583-587, 2011.

BHAT, Ratan V.; BUDD HAEBERLEIN, Samantha L.; AVILA, Jesús. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. **Journal of neurochemistry**, v. 89, n. 6, p. 1313-1317, 2004.

BLÁZQUEZ, E. et al. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, n. October, p. 161, 2014.

BOLMONT, Tristan et al. Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid- β -containing brain extract and by amyloid- β deposition in APP $\times$ Tau transgenic mice. **The American journal of pathology**, v. 171, n. 6, p. 2012-2020, 2007.

BOMFIM, Theresa R. et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1339-1353, 2012.

BOTION, Leida M.; DORETTO, Maria Carolina. Changes in peripheral energy metabolism during audiogenic seizures in rats. **Physiology & behavior**, v. 78, n. 4-5, p. 535-541, 2003.

BRAAK, Heiko et al. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. **Acta neuropathologica**, v. 112, n. 4, p. 389-404, 2006.

BROMLEY-BRITS, Kelley; DENG, Yu; SONG, Weihong. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 53, 2011.

BUCHT, Gösta et al. Changes in blood glucose and insulin secretion in patients with senile dementia of Alzheimer type. **Acta medica Scandinavica**, v. 213, n. 5, p. 387-392, 1983.

BURKS, D. J. et al. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 377-82, 2000.

BURLÁ, Claudia et al. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, p. 2949-2956, 2013.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CASTRO, Gabriel Perfeito et al. Wistar audiogenic rats display abnormal behavioral traits associated with artificial selection for seizure susceptibility. **Epilepsy & Behavior**, v. 71, p. 243-249, 2017.

CASTRO, O. W. et al. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain research**, v. 1374, p. 43-55, 2011.

CHI, Song et al. The prevalence of depression in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. **Current Alzheimer Research**, v. 12, n. 2, p. 189-198, 2015.

- CHISHTI, M. Azhar et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of APP695. **Journal of Biological Chemistry**, 2001.
- CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes research and clinical practice**, v. 138, p. 271-281, 2018.
- CHOUDHURY, A. I. et al. The role of insulin receptor substrate 2 in hypothalamic and β cell function. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 4, p. 940–950, 2005.
- CLARKE, Derrel W. et al. Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. **Journal of neurochemistry**, v. 47, n. 3, p. 831-836, 1986.
- COLE, A. R. et al. Molecular connexions between dementia and diabetes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 7, p. 1046–1063, 2007.
- CRAFT, Suzanne. The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. **Archives of neurology**, v. 66, n. 3, p. 300-305, 2009.
- CUMMINGS, Jeffrey L.; MORSTORF, Travis; ZHONG, Kate. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. **Alzheimer's research & therapy**, v. 6, n. 4, p. 37, 2014.
- CUNHA, A. O. S. et al. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. **Neuroscience**, v. 310, p. 114–127, 2015.
- D'HOOGE, Rudi; DE DEYN, Peter P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain research reviews**, v. 36, n. 1, p. 60-90, 2001.
- DAVIS, Hasker P.; SQUIRE, Larry R. Protein synthesis and memory: a review. **Psychological bulletin**, v. 96, n. 3, p. 518, 1984.
- DE LA MONTE, Suzanne M.; TONG, Ming; WANDS, Jack R. The 20-Year Voyage Aboard the Journal of Alzheimer's Disease: Docking at 'Type 3 Diabetes', Environmental/Exposure Factors, Pathogenic Mechanisms, and Potential Treatments. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 62, n. 3, p. 1381-1390, 2018.

DEVASKAR, Sherin U. et al. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8445-8454, 1994.

DORETTO, M. C. et al. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). **Behavior genetics**, v. 33, n. 1, p. 33-42, 2003.

DRUMMOND, Eleanor; WISNIEWSKI, Thomas. Alzheimer's disease: experimental models and reality. **Acta neuropathologica**, v. 133, n. 2, p. 155-175, 2017.

EBBINGHAUS, Hermann. Memory: A contribution to experimental psychology. **Annals of neurosciences**, v. 20, n. 4, p. 155, 2013.

ET MARINESCO, Blocq. Sur les lésions et la pathogénie de l'épilepsie dite essentielle. **Sem. méd**, p. 445, 1892.

FALCO, Anna De et al. Alzheimer's disease: etiological hypotheses and treatment perspectives. **Quimica Nova**, v. 39, n. 1, p. 63-80, 2016.

FAZAN, R. et al. Changes in autonomic control of the cardiovascular system in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain. **Epilepsy and Behavior**, v. 22, n. 4, p. 666–670, 2011.

FAZAN, R. et al. Evaluation of Cardiovascular Risk Factors in the Wistar Audiogenic Rat (WAR) Strain. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129574, 2015.

FITZGERALD, Lawrence W.; DOKLA, Carl PJ. Morris water task impairment and hypoactivity following cysteamine-induced reductions of somatostatin-like immunoreactivity. **Brain research**, v. 505, n. 2, p. 246-250, 1989.

FLOOD, James F.; MORLEY, John E.; ROBERTS, Eugene. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid beta protein from patients with Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 8, p. 3363-3366, 1991.

FORNY-GERMANO, Leticia et al. Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid- β oligomers in nonhuman primates. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 41, p. 13629-13643, 2014.

FRÖLICH, L. et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. **Journal of neural transmission**, v. 105, n. 4-5, p. 423-438, 1998.

GALVIS-ALONSO, O. Y.; DE OLIVEIRA, JA Cortes; GARCIA-CAIRASCO, N. Limbic epileptogenicity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in wistar audiogenic rats (WAR strain). **Neuroscience**, v. 125, n. 3, p. 787-802, 2004.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Audiogenic and audiogenic-like seizures: locus of induction and seizure severity determine postictal prolactin patterns. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 3, p. 503-510, 1996.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Diuresis and natriuresis in non-seizing and in kindled rats from a genetically audiogenic susceptible strain. **Neuroreport**, v. 5, n. 15, p. 1873-1876, 1994.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy research**, v. 26, n. 1, p. 177-192, 1996.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Reduced exploratory activity of audiogenic seizures susceptible Wistar rats. **Physiology & behavior**, v. 64, n. 5, p. 671–674, 1998.

GARCIA-CAIRASCO, N.; DORETTO, M. C.; LOBO, R. Genetic selection of a strain of Wistar rats susceptible to audiogenic seizures. A quantitative analysis. **Epilepsia**, v. 31, p. 815, 1990.

GARCIA-CAIRASCO, Norberto; UMEOKA, Eduardo HL; DE OLIVEIRA, José A. Cortes. The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. **Epilepsy & Behavior**, 2017.

GASPARINI, L. et al. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 6, p. 288–293, 2002.

GIDDINGS, S. J.; CHIRGWIN, J.; PERMUTT, M. A. Evaluation of rat insulin messenger RNA in pancreatic and extrapancreatic tissues. **Diabetologia**, v. 28, n. 6, p. 343-347, 1985.

GLENNER, George G.; WONG, Caine W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 120, n. 3, p. 885-890, 1984.

GODOY, L.D.; UMEOKA, E.H.L.; GARCIA-CAIRASCO, N. Characterization of depressive-like behaviors in the Wistar Audiogenic Rats (WAR) strain. Endophenotype model for epilepsy- depression comorbidity. **American Epilepsy Society Annual Meeting**, 2015.

GOELET, Philip et al. The long and the short of long-term memory—a molecular framework. **Nature**, v. 322, n. 6078, p. 419, 1986.

GRIFFIN, Rebecca J. et al. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. **Journal of neurochemistry**, v. 93, n. 1, p. 105-117, 2005.

GRUNDKE-IQBAL, Inge et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 13, p. 4913-4917, 1986.

HAASS, Christian et al. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. **Nature**, v. 359, n. 6393, p. 322, 1992.

HAN, Xiaojuan et al. Changes in insulin-signaling transduction pathway underlie learning/memory deficits in an Alzheimer's disease rat model. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 11, p. 1407-1416, 2012.

HANDEN, Benjamin L. et al. Imaging brain amyloid in nondemented young adults with Down syndrome using Pittsburgh compound B. **Alzheimer's & Dementia**, v. 8, n. 6, p. 496-501, 2012.

HAQUE, Rizwanul; NAZIR, Aamir. Insulin-degrading enzyme: a link between Alzheimer's and type 2 diabetes mellitus. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 13, n. 2, p. 259-264, 2014.

HARDY, John A.; HIGGINS, Gerald A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184, 1992.

HERNÁNDEZ, F. et al. GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. **Experimental Neurology**, v. 223, n. 2, p. 322–325, 2010.

HIROSUMI, Jiro et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333, 2002.

HOOPER, Claudie; KILLICK, Richard; LOVESTONE, Simon. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 104, n. 6, p. 1433-1439, 2008.

HORVÁTH, András et al. Epileptic seizures in Alzheimer disease: a review. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 30, n. 2, p. 186-192, 2016.

HSIAO, Karen et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. **Science**, v. 274, n. 5284, p. 99-103, 1996.

HUCKLEBERRY, Kylie A. et al. Dorsal and ventral hippocampal adult-born neurons contribute to context fear memory. **Neuropsychopharmacology**, p. 1, 2018.

JANUS, Christopher et al. A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. **Nature**, v. 408, n. 6815, p. 979, 2000.

JIA, Shi-Liang et al. Neuroprotective effects of liquiritin on cognitive deficits induced by soluble amyloid- β 1–42 oligomers injected into the hippocampus. **Journal of Asian natural products research**, v. 18, n. 12, p. 1186-1199, 2016.

KAMINARI, Archontia et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) rescues insulin-mediated impairment in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 683, 2017.

KANDIMALLA, R.; THIRUMALA, V.; REDDY, P. H. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A Critical Appraisal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 2016.

LAMBERT, Mary P. et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6448-6453, 1998.

LAMBERTY, Y.; KLITGAARD, H. Consequences of Pentylene-tetrazole Kindling on Spatial Memory and Emotional Responding in the Rat. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 1, n. 4, p. 256–261, ago. 2000.

LANNERT, Heinrich; HOYER, Siegfried. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behavioral neuroscience**, v. 112, n. 5, p. 1199, 1998.

LAVIN, D. P.; WHITE, M. F.; BRAZIL, D. P. IRS proteins and diabetic complications. **Diabetologia**, 2016.

LEE, Yichien et al. Divergent brain changes in two audiogenic rat strains: A voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging comparison of the genetically epilepsy prone rat (GEPR-3) and the Wistar Audiogenic Rat (WAR). **Neurobiology of disease**, v. 111, p. 80-90, 2018.

LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CAVALHEIRO, E. A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy research**, v. 50, n. 1-2, p. 93-103, 2002.

LESZEK, Jerzy et al. Type 3 Diabetes Mellitus: a novel implication of Alzheimers disease. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 17, n. 12, p. 1331-1335, 2017.

LI, Xue-Liang et al. Spatial memory deficit and emotional abnormality in OLETF rats. **Physiology & behavior**, v. 75, n. 1-2, p. 15-23, 2002.

LINDNER, Mark D. Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the Morris water maze. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 203-220, 1997.

LINDWALL, Glen; COLE, R. David. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 8, p. 5301-5305, 1984.

LIU, Ying et al. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. **The Journal of pathology**, v. 225, n. 1, p. 54-62, 2011.

LYKETSOS, Constantine G.; OLIN, Jason. Depression in Alzheimer's disease: overview and treatment. **Biological psychiatry**, v. 52, n. 3, p. 243-252, 2002.

MA, Tao; KLANN, Eric. Amyloid β : linking synaptic plasticity failure to memory disruption in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 120, p. 140-148, 2012.

MACKENZIE, Ian RA; MILLER, Laurie A. Senile plaques in temporal lobe epilepsy. **Acta neuropathologica**, v. 87, n. 5, p. 504-510, 1994.

MAJ, Magdalena et al. The microtubule-associated protein tau and its relevance for pancreatic beta cells. **Journal of diabetes research**, v. 2016, 2016. MARCINIAK, Elodie et al. Tau deletion promotes brain insulin resistance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 8, p. 2257-2269, 2017.

MARESCAUX, Ch et al. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. **Experimental neurology**, v. 97, n. 1, p. 160-168, 1987.

MARKS, Jonathan L. et al. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. **Endocrinology**, v. 127, n. 6, p. 3234-3236, 1990.

MAZANETZ, Michael P.; FISCHER, Peter M. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 6, p. 464, 2007.

MILES, W. R.; ROOT, H. F. Psychologic tests applied to diabetic patients. **Archives of Internal Medicine**, v. 30, n. 6, p. 767-777, 1922. MURPHY, M. Paul; LEVINE III, Harry. Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 19, n. 1, p. 311-323, 2010.

MORAES, Márcio Flávio Dutra; GALVIS-ALONSO, Orfa Yineth; GARCIA-CAIRASCO, Norberto. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy research**, v. 39, n. 3, p. 251-259, 2000.

MORAN, Chris et al. Neuroimaging and its relevance to understanding pathways linking diabetes and cognitive dysfunction. **Journal of Alzheimer's Disease**, n. Preprint, p. 1-15, 2017.

MORRIS, R. G. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. **Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 3040-3057, 1989.

MORRIS, Richard. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984.

MULLINS, Roger J. et al. Exosomal biomarkers of brain insulin resistance associated with regional atrophy in Alzheimer's disease. **Human brain mapping**, v. 38, n. 4, p. 1933-1940, 2017.

NICASTRO, Nicolas; ASSAL, Frédéric; SEECK, Margitta. From here to epilepsy: the risk of seizure in patients with Alzheimer's disease. **Epileptic Disorders**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2016.

PARDESHI, Rohit et al. Insulin signaling: An opportunistic target to minify risk of Alzheimer's disease. **Psychoneuroendocrinology**, 2017.

PARDRIDGE, William M.; EISENBERG, Jody; YANG, Jing. Human blood—brain barrier insulin receptor. **Journal of neurochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1771-1778, 1985.

PAXINOS, G.; Watson, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates** (Compact 3rd Edition), Academic Press, Sydney, 1997.

PEI, Jin-Jing et al. Distribution of active glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 58, n. 9, p. 1010-1019, 1999.

PEI, Jin-Jing et al. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. **Acta neuropathologica**, v. 105, n. 4, p. 381-392, 2003.

PEREIRA, Fernanda KS et al. Peripheral glucose metabolism is altered by epileptic seizures. **Metabolic brain disease**, v. 23, n. 1, p. 105-114, 2008.

PEREIRA, M. G. A. G.; SANTOS, V. R.; OLIVEIRA, J. A. C. ;Garcia-Cairasco N. Possible association between epilepsy and Alzheimer's Disease in the Wistar Audiogenic Rat (WARs) strain. In: **American Epilepsy Society Meeting**, 2012, San Diego. American Epilepsy Society Meeting, 2012.

PHIEL, Christopher J. et al. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. **Nature**, v. 423, n. 6938, p. 435-439, 2003.

PLUM, Leona; SCHUBERT, Markus; BRÜNING, Jens C. The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 59-65, 2005.

PUGAZHENTHI, Subbiah; QIN, Limei; REDDY, P. Hemachandra. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1037-1045, 2017.

PUZZO, Daniela et al. Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. **Annals of neurology**, v. 69, n. 5, p. 819-830, 2011.

QIAO, Li-ya et al. Identification of enhanced serine kinase activity in insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 15, p. 10625-10632, 1999.

QING, Hong et al. Valproic acid inhibits A β production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 12, p. 2781-2789, 2008.

QIU, Wei Qiao; FOLSTEIN, Marshal F. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid- β peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. **Neurobiology of aging**, v. 27, n. 2, p. 190-198, 2006.

RAJMOHAN, R.; REDDY, P. H. Amyloid-Beta and Phosphorylated Tau Accumulations Cause Abnormalities at Synapses of Alzheimer's disease Neurons. **Journal of Alzheimer's Disease**, p. 1–25, 2016.

RAMMES, Gerhard et al. MRZ-99030—A novel modulator of A β aggregation: II—Reversal of A β oligomer-induced deficits in long-term potentiation (LTP) and cognitive performance in rats and mice. **Neuropharmacology**, v. 92, p. 170-182, 2015.

REID, K. H. et al. Audiogenic seizures following global ischemia induced by chest compression in Long-Evans rats. **Epilepsy Research**, v. 23, n. 3, p. 195–209, 1996.

REISBERG, Barry et al. Behavioral symptoms in Alzheimer's disease: phenomenology and treatment. **The Journal of clinical psychiatry**, 1987.

RIAZ, Sadia et al. Ventral, but not dorsal, hippocampus inactivation impairs reward memory expression and retrieval in contexts defined by proximal cues. **Hippocampus**, v. 27, n. 7, p. 822-836, 2017.

ROMCY-PEREIRA, R. N.; GARCIA-CAIRASCO, N. Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining. **Neuroscience**, v. 119, n. 2, p. 533-546, 2003.

ROSSETTI, F. et al. Behavioral and EEG effects of GABAergic manipulation of the nigro-tectal pathway in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain II: An EEG wavelet analysis and retrograde neuronal tracer approach. **Epilepsy and Behavior**, v. 24, n. 4, p. 391–398, 2012.

ROSSETTI, Franco et al. EEG wavelet analyses of the striatum–substantia nigra pars reticulata–superior colliculus circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in Wistar audiogenic rats (WAR strain). **Epilepsy research**, v. 72, n. 2-3, p. 192-208, 2006.

ROVNER, Barry W. et al. Depression and Alzheimer's disease. **Am J Psychiatry**, v. 146, n. 3, p. 350-353, 1989.

RUMBLE, Baden et al. Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 22, p. 1446-1452, 1989.

SANTACRUZ, K. et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 476-481, 2005.

SATO, T. et al. Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. **American journal of Alzheimer's disease and other dementias**, v. 21, n. 3, p. 197–208, 2006.

SCHECHTER, R. et al. Insulin synthesis by isolated rabbit neurons. **Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 505-513, 1988.

SCHECHTER, Ruben et al. Developmental regulation of insulin in the mammalian central nervous system. **Brain research**, v. 582, n. 1, p. 27-37, 1992.

SCHUBERT, Markus et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3100-3105, 2004.

SCHULINGKAMP, R. J. et al. Insulin receptors and insulin action in the brain: Review and clinical implications. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 8, p. 855–872, 2000.

SCHWARTZ, M. W. et al. Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. **The Journal of clinical investigation**, v. 88, n. 4, p. 1272-1281, 1991.

SELKOE, Dennis J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological reviews**, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001.

SELKOE, Dennis J. et al. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 19, p. 7341-7345, 1988.

SELKOE, Dennis J.; HARDY, John. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO molecular medicine**, v. 8, n. 6, p. 595-608, 2016.

SEUBERT, Peter et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids. **Nature**, v. 359, n. 6393, p. 325, 1992.

SHANKAR, Ganesh M. et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. **Nature medicine**, v. 14, n. 8, p. 837, 2008.

SHERAFAT, M. A. et al. Kindling-induced learning deficiency and possible cellular and molecular involved mechanisms. **Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology**, v. 34, n. 6, p. 883–90, jun. 2013.

SHUVAEV, Vladimir V. et al. Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 22, n. 3, p. 397-402, 2001.

SMITH, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.** 150, 76–85.

SOUZA, Leandro Cattelan et al. Aging exacerbates cognitive and anxiety alterations induced by an intracerebroventricular injection of amyloid- β 1–42 peptide in mice. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 88, p. 93-106, 2018.

SPIES, Petra E. et al. Reviewing reasons for the decreased CSF Abeta42 concentration in Alzheimer disease. **Front Biosci**, v. 17, p. 2024-34, 2012.

STECK, Natassa; COOPER, Claudia; ORGETA, Vasiliki. Investigation of possible risk factors for depression in Alzheimer's disease: A systematic review of the evidence. **Journal of affective disorders**, 2018.

STEEN, Eric et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes?. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 7, n. 1, p. 63-80, 2005.

STELZMANN, Rainulf A.; NORMAN SCHNITZLEIN, H.; REED MURTAGH, F. An English translation of Alzheimer's 1907 paper,“Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde”. **Clinical Anatomy: The Official Journal of the American Association of Clinical Anatomists and the British Association of Clinical Anatomists**, v. 8, n. 6, p. 429-431, 1995.

STRANGE, Bryan A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 655, 2014.

SUN, Xiulian et al. Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 49, p. 18727-18732, 2006.

SUTHERLAND, Greg T. et al. Epidemiological approaches to understanding the link between type 2 diabetes and dementia. **Journal of Alzheimer's Disease**, n. Preprint, p. -1-11, 2017.

SWATTON, Jane E. et al. Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 2711-2719, 2004.

SZYNDLER, Janusz et al. Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test and amino acid concentrations in brain structures. **Pharmacological reports**, v. 58, n. 1, p. 75, 2006.

TAKASHIMA, Akihiko. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 9, n. s3, p. 309-317, 2006.

TALBOT, Konrad et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1316-1338, 2012.

TESSIER, Daniel M.; MENEILLY, Graydon S. Diabetes in an older woman living in a long-term care residence. **Canadian Medical Association Journal**, v. 187, n. 4, p. 269-271, 2015.

TOWBIN, Harry; STAEHELIN, Theophil; GORDON, Julian. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TOWNSEND, Mary K. et al. The relation between insulin, insulin-related factors, and plasma amyloid beta peptide levels at mid-life in a population-based study. **Alzheimer disease and associated disorders**, v. 26, n. 1, p. 50, 2012.

TURNER, Paul R. et al. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. **Progress in neurobiology**, v. 70, n. 1, p. 1-32, 2003.

UMEOKA, E. H. L. et al. Functional characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain. **Brain Research**, v. 1381, p. 141-147, 2011.

VERDILE, G.; FULLER, S. J.; MARTINS, R. N. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 84, p. 22-38, 2015.

VILLELA, Isabela et al. Apresentação de pôster: "Estudo da sensibilidade olfatória como possível biomarcador de Doença de Alzheimer experimental em animais da cepa *Wistar Audiogenic Rat (WAR)*", no Congresso Médico Acadêmico da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (2016).

VORHEES, Charles V.; WILLIAMS, Michael T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature protocols**, v. 1, n. 2, p. 848, 2006.

WEINGARTEN, Murray D. et al. A protein factor essential for microtubule assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 5, p. 1858-1862, 1975.

WENK, Gary L. Assessment of spatial memory using the radial arm maze and Morris water maze. **Current protocols in neuroscience**, p. 8.5 A. 1-8.5 A. 12, 2004.

WERTHER, GEORGE A. et al. Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. **Endocrinology**, v. 121, n. 4, p. 1562-1570, 1987.

WILDEN, Peter A. et al. The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 19, p. 13719-13727, 1992.

WINOCUR, Gordon et al. Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. **Behavioral neuroscience**, v. 119, n. 5, p. 1389, 2005.

WITHERS, D. J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, n. February, p. 900–904, 1998.

WONG, Ryan S.; CECETTO, David F.; WHITEHEAD, Shawn N. Assessing the Effects of Acute Amyloid β Oligomer Exposure in the Rat. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1390, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Report on Diabetes**. p. 88, 2016.

XU, Shujun et al. Rosiglitazone prevents the memory deficits induced by amyloid-beta oligomers via inhibition of inflammatory responses. **Neuroscience letters**, v. 578, p. 7-11, 2014.

YAMAGUCHI, Fuminori et al. Transgenic mice for the amyloid precursor protein 695 isoform have impaired spatial memory. **Neuroreport: An International Journal for the Rapid Communication of Research in Neuroscience**, 1991.

YAMAGUCHI, Haruyasu et al. Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. **Acta neuropathologica**, v. 92, n. 3, p. 232-241, 1996.

YANG, Y.; SONG, W. Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus. **Neuroscience**, v. 250, p. 140–150, 2013.

YARCHOAN, Mark et al. Abnormal serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 is associated with tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies. **Acta neuropathologica**, v. 128, n. 5, p. 679-689, 2014.

YARCHOAN, Mark; ARNOLD, Steven E. Repurposing diabetes drugs for brain insulin resistance in Alzheimer disease. **Diabetes**, p. DB_140287, 2014.

YOUNG, W. Scott. Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. **Neuropeptides**, v. 8, n. 2, p. 93-97, 1986.

ZHANG, Shuman et al. Protective effect of melatonin on soluble A β 1–42-induced memory impairment, astrogliosis, and synaptic dysfunction via the Musashi1/Notch1/Hes1 signaling pathway in the rat hippocampus. **Alzheimer's research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 40, 2016.

ZHENG, W.-H. et al. Amyloid β peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. **Neuroscience**, v. 115, n. 1, p. 201-211, 2002.

ZUSSY, Charleine et al. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- β peptide injection in rats. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53117, 2013.

ANEXO I

Figura 50 – Detecção de Aβ-42 humano sintético (*Anaspec 20276-1*) em extratos de hipocampo de ratos WAR (3 meses). Detecção de Aβ-42 humano sintético em extratos de hipocampo de ratos WAR submetidos à injeção intracerebroventricular de veículo e AβO pelo método de Elisa utilizando o kit *Human Aβ42 ELISA* (catalog number KHB3441- ThermoFisher). Teste t de student. $p > 0,05$.