CAIO HENRIQUE YOKOYAMA MAZUCANTI

**SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DESENCADEADA POR CONCENTRAÇÕES SUBTÓXICAS DE
ESTREPTOZOTOCINA EM CÉLULAS NEURO-2A:
MODELO IN VITRO DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADA À DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

CAIO HENRIQUE YOKOYAMA MAZUCANTI

**SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DESENCADEADA POR CONCENTRAÇÕES SUBTÓXICAS DE
ESTREPTOZOTOCINA EM CÉLULAS NEURO-2A:
MODELO IN VITRO DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADA À DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Cristóforo Scavone

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Mazucanti, Caio Henrique Yokoyama.

Sinalização intracelular desencadeada por concentrações subtóxicas de estreptozotocina em células Neuro-2A: modelo *in vitro* de neurodegeneração associada à doença de Alzheimer / Caio Henrique Yokoyama Mazucanti. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Cristóforo Scavone.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Doenças neurodegenerativas e sinalização de insulina no sistema nervoso central.

Versão do título para o inglês: Intracellular signaling triggered by Streptozotocin subtoxic concentration in Neuro-2A cells: *in vitro* Alzheimer's disease associated neurodegeneration model.

1. Doença de Alzheimer 2. Estreptozotocina 3. Diabetes mellitus
4. Resistência insulínica 5. Óxido nítrico modelo *in vitro* de neurodegeneração associada à doença de Alzheimer 6. Espécies reativas de oxigênio I. Scavone, Prof. Dr. Cristóforo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB036/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caio Henrique Yokoyama Mazucanti.

Título da Dissertação: Sinalização intracelular desencadeada por concentrações subtóxicas de estreptozotocina em células Neuro-2A: modelo *in vitro* de neurodegeneração associada à doença de Alzheimer.

Orientador(a): Prof. Dr. Cristóforo Scavone.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 440/11 referente ao projeto intitulado: *“Sinalização intracelular desencadeada por concentração subtóxica de estreptozotocina em células Neuro2A: Modelo in vitro de Neurodegeneração associada ao Alzheimer”* sob a responsabilidade de **Caio Henrique Yokoyama Mazucanti**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus professores e mentores (tanto os oficiais quanto os colegas de longas conversas)
que tão ativamente participaram da minha formação intelectual; e aos meus pais e
familiares (biológicos ou de convívio), por confiarem em mim e no meu caminho escolhido e
viabilizarem a trajetória.

Obrigado

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Comunicação Neuronal e ao Laboratório de Neurobiologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas pela confiança e pelas portas constantemente abertas a mim.

Aos professores e amigos (de trabalho), Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz e Lidia Mitiko Yshii, pelas contribuições pontuais importantes para este trabalho, e todos do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular e do Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, por construírem um ambiente intelectual de alto nível do qual este projeto (e eu) tanto se beneficiou.

Aos meus amigos, pela paciência necessária para estar ao meu lado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

“O que não consigo construir, não consigo compreender”
Richard Feynman

RESUMO

MAZUCANTI, C. H. Y. **Sinalização intracelular desencadeada por concentrações subtóxicas de estreptozotocina em células Neuro-2A**: modelo *in vitro* de neurodegeneração associada à doença de Alzheimer. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A Doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência e é caracterizada clinicamente por comprometimentos cognitivos. Histologicamente compõe-se pela formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares intracelulares resultantes de alterações do metabolismo do peptídeo beta-amiloide e da hiperfosforilação da proteína Tau, respectivamente. Essas alterações parecem, em parte, ser uma decorrência de uma resistência encefálica à insulina e consequente diminuição da sinalização neuronal desse hormônio, sugerindo que a DA esporádica tenha uma relação com o Diabetes mellitus. A estreptozotocina (STZ) tem sido utilizada como modelo de indução do Diabetes, e mais recentemente, sua injeção intracerebroventricular (icv) tem sido utilizada como modelo animal de DA. Nosso objetivo neste trabalho é o de avaliar os efeitos causados por doses subtóxicas de STZ em uma linhagem de neuroblastoma sobre a cascata intracelular associada à sinalização de insulina. Para tanto, o estado de fosforilação das proteínas Akt e GSK3- β foi avaliado em períodos agudos de tratamento com a droga, bem como a responsividade dessas células à insulina após 48 horas de tratamento. Para avaliação de efeitos morfológicos foi provocada neuritogênese por tratamento com NGF e o aparecimento e comprimento de neuritos comparados entre grupo controle, grupo resistente à insulina e grupo pré-tratado com STZ. Foi feita averiguação da doação espontânea de óxido nítrico (NO) por detecção eletroquímica e avaliação da participação do NO nas ações da STZ através do tratamento simultâneo com STZ e Carboxi-PTIO (sequestrante de NO). Por fim, a avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) decorrente do tratamento com STZ foi avaliada utilizando-se uma sonda fluorescente sensível a superóxido, a dihidroetidina (DHE), por fluorimetria em citometria de fluxo. Os resultados confirmam a doação espontânea de NO pela STZ e sugerem que a droga é capaz de modular a cascata intracelular associada ao receptor de insulina em períodos agudos através da nitrosilação e consequente inativação da Akt, o que acaba regulando positivamente a atividade da GSK3- β . A capacidade da STZ de induzir resistência insulínica também é afetada pelo sequestro do NO, indicando que o radical livre desempenha papel fundamental na indução do fenômeno nas condições experimentais utilizadas. O perfil de produção de EROs induzido por STZ pode ser a causa da sua neurotoxicidade. Por fim, foi visto que o tratamento com STZ, bem como a indução de resistência à insulina, é capaz de impedir a formação de neuritos pelo tratamento com NGF. Dessa forma, este trabalho contribui para a elucidação dos mecanismos pelos quais a injeção icv de STZ pode causar algumas características de toxicidade neuronal semelhantes à DA.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Estreptozotocina. Diabetes mellitus. Resistência insulínica. Óxido nítrico. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

MAZUCANTI, C. H. Y. **Intracellular signaling triggered by streptozotocin subtoxic concentrations in Neuro-2A cells: *in vitro* Alzheimer's disease associated neurodegeneration model.** 2013. 75 p. Masters thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly and is clinically characterized as cognitive impairments. It is histologically characterized by senile plaques formation, as well as by intracellular neurofibrillary tangles due to amyloid-beta metabolism alterations and hyperphosphorylation of the microtubule associated protein Tau, respectively. These alterations seems to be, at least in part, caused by a encephalic insulin resistance and consequent impairment in its neuronal signaling, suggesting that the sporadic form of DA might be correlated to Diabetes. Streptozotocin (STZ) has been used as an animal model for Diabetes and, more recently, its intracerebroventricular (icv) injection as an AD animal model. Our objective with this project involves the assessment of the effects caused by subtoxic doses of STZ in a neuroblastoma cell line upon insulin signaling associated intracellular cascade. For this purpose, we accompanied the phosphorylation state of Akt and GSK3- β in acute periods of time following STZ treatment, as well as the responsiveness of such cells against insulin after a 48 hours treatment. For morphological effects evaluation, neuritogenesis was induced by a NGF treatment and neurite outgrowth compared between different experimental groups. Nitric oxide (NO) spontaneous donation was assessed by electrochemical detection and its participation in STZ actions through simultaneous treatment of STZ and Carboxy-PTIO (a NO scavenger). In addition, reactive oxygen species (ROS) production due to STZ treatment was assessed using a superoxide sensitive fluorescent probe, dihydroethidium (DHE) by flow cytometry fluorimetry. Results confirm STZ spontaneous NO donation and suggest that the drug is capable of modulating the intracellular cascade associated to insulin receptor in acute periods of time through Akt nitrosylation and its subsequent inactivation, which could up regulate GSK3- β activity. STZ ability to cause insulin resistance is also affected by NO production, which indicates that the free radical plays an essential role in the phenomenon induction in this experimental approach. Therefore, EROs production may play an important role in the mechanism linked to STZ induced neurotoxicity. Ultimately, it has been shown that STZ treatment, as well as insulin resistance alone, is capable of impair neurite outgrowth by NGF treatment. This work contributes for the elucidation of the mechanisms by which STZ icv injection may cause features similar to DA.

Keywords: Alzheimer's disease. Streptozotocin. Diabetes. Insulin resistance. Nitric oxide. Reactive oxygen species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Resumo das alterações de expressão e/ou atividade de proteínas quinases e proteínas fosfatases na DA.....	19
Figura 1 - Mecanismo proposto de dano oxidativo e desbalanço energético provocado pela STZ.....	22
Figura 2 - Possíveis interferências na cascata de sinalização de insulina provocadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	25
Figura 3 - Efeitos de diversas concentrações de STZ na viabilidade de células Neuro2A avaliada pela redução de MTT.....	35
Figura 4 - Efeitos de diversas concentrações de STZ na viabilidade de células Neuro2A avaliada pela redução de MTT.....	36
Figura 5 - Efeitos de diversas concentrações de STZ na viabilidade de células Neuro2A.....	37
Quadro 2 - Concentrações de NO calculadas em diferentes períodos após dissolução da STZ em meio de cultura.....	39
Figura 6 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de Akt e sua forma fosforilada uma hora após o estímulo da droga.....	40
Figura 7 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de Akt e sua forma fosforilada duas horas após o estímulo da droga.....	41
Figura 8 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de Akt e sua forma fosforilada três horas após o estímulo da droga.....	42
Figura 9 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de GSK3- β e sua forma fosforilada uma hora após o estímulo da droga.....	43
Figura 10 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de GSK3- β e sua forma fosforilada duas horas após o estímulo da droga.....	43
Figura 11 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de GSK3- β e sua forma fosforilada três horas após o estímulo da droga.....	44
Figura 12 - Efeito do tratamento simultâneo de STZ e carboxi-PTIO sobre a expressão de p-GSK3- β em diferentes períodos após o estímulo da droga.....	45
Figura 13- Estado de fosforilação da proteína Akt em diferentes períodos após estímulo com insulina.....	46
Figura 14 - Efeitos de concentrações subtóxicas de estreptozotocina sobre a responsividade à insulina.....	48
Figura 15 - Efeitos de tratamento conjunto de STZ e carboxi-PTIO sobre a responsividade à insulina.....	49
Figura 16 - Efeitos do tratamento crônico com 100nM de insulina sobre a responsividade ao hormônio.....	51
Figura 17 - Efeitos morfológicos do tratamento de STZ em diversos tempos de incubação sobre células Neuro2-A.....	52
Figura 18 - Níveis de fluorescência de marcação com DHE após tratamento de estreptozotocina em diferentes tempos de incubação com a droga.....	53
Figura 19 - Médias de fluorescência do DHE em diferentes períodos de tratamento com STZ.....	53
Figura 20 - Fotomicrografias das células neuro 2A submetidas a imunofluorescência com anticorpo anti α -tubulina.....	55
Figura 21 - Reação proposta para a oxidação do NO pela carboxi-PTIO.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

abs: Absorbância	g: Gramas
ADP: Difosfato de Adenosina	GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida
AMP: Monofosfato de Adenosina	GLUT: Transportador de Glicose
ANOVA: Análise de Variância	GSK3: Glicogênio Sintase Quinase 3
APP: Proteína Precursora do Amiloide	h: Hora
ATP: Trifosfato de Adenosina	HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfônico
Bad: Promotor de Morte Associado a Bcl-2	icv: Intracerebroventricular
BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro	IR: Receptor de Insulina
Cdc 25A: Homólogo A do Ciclo de Divisão Celular 24	IRS: Substratos do Receptor de Insulina
Cdc 25B: Homólogo B do Ciclo de Divisão Celular 2B	JNK: Quinase C-Jun N-terminal
Cdk 5: Quinase Dependente de Ciclina 5	KCl: Cloreto de Potássio
ChAT: Colina Acetil Transferase	KH ₂ PO ₄ : Fosfato de Potássio Mono-básico
CKI: Proteína Inibidora de Quinases Dependentes de Ciclina	L: Litro
CO ₂ : Dióxido de Carbono	LDH: Lactato Desidrogenase
CTL: Controle	MAP3K - Quinase da Quinase da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
D.O.: Densidade Óptica	MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
DA : Doença de Alzheimer	MEK: Quinase de Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
DAE: Doença de Alzheimer Esporádica	mg: Miligrama
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole	min: Minuto
DCF-DA: Diclorofluoresceína Diacetato	MIT: Mitocôndria
DHE: dihidroetidina	mL: Mililitro
DM: Diabetes Mellitus	mm: Milímetro
DMEM: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco	mM: Milimolar
DMSO: Dimetilsulfóxido	Na ₂ HPO ₄ : Fosfato de Sódio Dibásico
DNA: Ácido Desoxirribonucleico	NaCl :Cloreto de Sódio
DTT: Ditiotrito	NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
Dyrk: Quinase Regulada por Fosforilação em Tirosina Duplamente Específica	NaHCO ₃ : Bicarbonato de Sódio
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético	NFKB: Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
ERK: Quinase Regulada por Sinais Extra-Celulares	NFT: Emaranhado Neurofibrilar
ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio	ng: Nanograma
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio	NGF: Fator de Crescimento de Nervos
EtOH: Etanol	nm: Nanômetro
FoxO: Proteína Forkhead Box O	nM: Nanomolar
	NO: Óxido Nítrico

NO: Óxido Nítrico
NOA: Analisador de Óxido Nítrico
PBS: Solução Balanceada ou Tampão
Salina
PET: Tomografia por Emissão de Pósitrons
PI3K: Fosfoinosítideo 3 Quinase
PIP2: Fosfatidil Inositol 2-Fosfato
PIP3: Fosfatidil Inositol 3-Fosfato
PKA: Proteína Quinase A
PKB: Proteína Quinase B
PKC: Proteína Quinase C
PMSF: - (Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoreto)
PP: Proteína Fosfatase
PP1: Proteína Fosfatase 1
PP2A: Proteína Fosfatase 2A
PP2B: Proteína Fosfatase 2B
PP5: Proteína Fosfatase 5
PTEN: Homólogo de Fosfatase e Tensina
PTP: Proteína Tirosina Fosfatase
RyR: Receptores de Rianodina
SAPK: Proteínas Quinases Ativadas por Estresse
Ser: Serina
SFB: Soro Fetal Bovino
SOD: Superóxido Dismutase
Sos: Son of Sevenless
SPECT: Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
STZ: Streptozotocina
Thr: Treonina
TrkA: Receptor Tirosina Quinase A
U.I.: Unidade Internacional
V: volts
XOD: Xantina Oxidase
 β A: Beta-amiloide
 μ g: micrograma
 μ m: micrômetro
 μ M: micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Doença de Alzheimer	15
1.2 Sinalização Associada à Neurodegeneração na DA.....	17
1.3 Metabolismo Encefálico na DA e o Modelo da STZ.....	21
1.4 Objetivos	26
2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1 Cultivo de Células	27
2.2 Viabilidade Celular.....	27
2.2.1 Ensaio de viabilidade celular: redução de formazan colorido (MTT)	27
2.2.2 Ensaio de viabilidade celular: liberação de lactato desidrogenase (LDH)	28
2.3 Medição de Óxido Nítrico por Quimioluminescência	28
2.4 Ensaios de Western Blotting	29
2.4.1 Avaliação da cinética de sinalização do receptor de insulina.....	30
2.4.2 Acompanhamento do estado de fosforilação da Akt e GSK3-β	30
2.4.3 Desafio de insulina.....	30
2.4.4 Indução de resistência insulínica	31
2.5 Medição de EROs por Fluorimetria em Citometria de Fluxo	31
2.6 Ensaio de Imunofluorescência.....	32
2.6.1 Tratamento com NGF.....	33
3 RESULTADOS	34
3.1 Viabilidade Celular (MTT).....	34
3.2 Citotoxicidade (LDH)	37
3.3 Doação Espontânea de NO.....	38
3.4 Western Blotting	39
3.4.1 Estado de fosforilação da Akt e GSK3-β	39
3.4.2 Cinética da sinalização do receptor de insulina	46
3.4.3 Desafio de insulina.....	47
3.4.4 Indução de resistência insulínica	50
3.5 Avaliação de EROs por DHE e Citometria de Fluxo	51
3.6 Indução de Neuritogênese e Imunofluorescência	54

4 DISCUSSÃO.....	56
5 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) se apresenta atualmente como sendo a principal causa de demência no mundo ocidental, sendo o envelhecimento o principal fator de risco e, em certa maneira, uma necessidade para o desenvolvimento da patologia (HEBERT et al., 2003). O mesmo ocorre em diversas outras doenças neurodegenerativas, como Parkinson e outras demências causadas por corpos de Lewis, sendo a ocorrência de todas essas síndromes muito rara em pessoas jovens ou mesmo adultos de meia idade.

A DA é a causa principal de demência entre os idosos, e está associada a um dano progressivo em funções encefálicas, incluindo memória, linguagem, orientação espacial, comportamento e personalidade. Estima-se que existem atualmente 36 milhões de pessoas em todo o mundo vivendo com DA, e espera-se que esse número cresça drasticamente nas próximas décadas. A DA é uma doença multifatorial e cerca de 90% dos casos são de uma ocorrência esporádica (revisado em QUERFURTH; LAFERLA, 2010), sendo a idade o principal fator de risco. Outros fatores de risco importantes relacionam-se a condições metabólicas e vasculares, compondo o cenário da “síndrome metabólica”, como dislipidemia e hipertensão, bem como a hiperglicemia. De fato, a diabetes tipo II está associada a um maior risco de desenvolvimento de DA e demência vascular (revisado em BIESSELS; KAPPELLE, 2005).

Os principais fatores de risco parecem ser a idade, contribuições genéticas e ambientais, sendo bem nítida a divisão entre dois tipos diferentes da DA, de acordo com o momento da instalação da doença. Nesse sentido, a DA Esporádica acontece de forma tardia, aparecendo a partir dos 60 anos de idade, enquanto a DA Familiar tem acontecimento mais precoce, ao redor dos 40 anos (KAR et al., 2004; SPIRES; HYMAN, 2005).

A DA é uma síndrome relativamente comum, cujo diagnóstico se dá por aparecimento de características envolvendo comprometimentos cognitivos e comportamentais progressivos associados com a idade, tais como perda de memória, desorientação geográfica, deterioração da linguagem (FABER-LANGENDOEN et al., 1988), mudanças de comportamento e personalidade (RUBIN et al., 1987; SWEARER et al., 1988) e complicações motoras em estágios avançados da doença (MORRIS et al., 1989). No entanto,

quando sinais de comprometimentos cognitivos devido à DA são manifestados, já existe um processo patológico encefálico irreversível (IKONOMOVIC; MUFSON; WUU, 2003).

Atualmente o diagnóstico somente é possível após aparecimento de comprometimentos cognitivos moderados, identificados através de diferentes testes que avaliam diversas competências cognitivas. Estes testes auxiliam o diagnóstico da DA, porém estão longe de apresentarem sensibilidade e especificidade confiáveis (FRANK; MALCOLM; DEAN, 2009; KOIBAS et al., 2000). Outra ferramenta utilizada para o diagnóstico são os exames de imagem, capazes de detectar estágios mais iniciais da doença ao identificar pequenas degenerações de áreas específicas associadas à DA, cuja atrofia inicia-se no córtex entorrinal e hipocampo e evolui para o neocórtex. Técnicas mais modernas podem ainda revelar diferentes padrões de hipoperfusão (por Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único - SPECT) (O'BRIEN, 2007) ou hipometabolismo, além de conseguirem identificar alterações bioquímicas específicas da DA através de marcadores (por Tomografia por Emissão de Pósitrons - PET) (EDWARD; SUSAN; MARTIN, 2004).

Clinicamente, a DA é caracterizada por perda de memória e declínio cognitivo progressivos, culminando na morte prematura do paciente, em média após dez anos do diagnóstico (QUERFURTH; LAFERLA, 2010). Além disso, a DA é acompanhada por sintomas neuropsiquiátricos não cognitivos, que incluem ansiedade, agressividade, delírio, excitação ou apatia, desinibição ou depressão (revisado em PINTON et al., 2011). Padrões neuropatológicos específicos da DA incluem perda neuronal, acumulação abundante de emaranhados neurofibrilares anormais (correspondentes a depósitos intracelulares da proteína Tau hiperfosforilada) e aumento na expressão e processamento anormal da proteína precursora do beta-amiloide (APP), levando à deposição do peptídeo beta-amiloide (β A) e, dessa forma, à formação de placas senis. Outra característica da DA é a angiopatia amiloide. É possível que a disfunção cerebrovascular possa preceder o declínio cognitivo. Hipoperfusão encefálica e diminuição da depuração de β A através da barreira hemato-encefálica podem contribuir para a instalação e progressão da DA. Ainda existem evidências indicando o envolvimento da microglia desempenhando um papel importante através de todo esse processo patológico (revisado em BELL; ZLOKOVIC, 2009).

As características bioquímicas específicas da DA envolvem o desenvolvimento de emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFT) e de posição de placas senis, formados

pelo acúmulo de segmentos proteicos resultantes de metabolismo anormal da proteína precursora do peptídeo amiloide e consequente agregação do peptídeo beta-amiloide, com diminuição de sua degradação por proteases (KANG et al., 1987). Os NFTs são formados a partir do colapso do citoesqueleto do neurônio, decorrente da hiperfosforilação da proteína associada a microtúbulo Tau (ALEJANDRA et al., 2010), e consequente perda neuronal com diminuição da massa encefálica.

1.2 Sinalização Associada à Neurodegeneração na DA

Alguns autores acreditam que a DA é iniciada por deficiência de enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, atividade reduzida da citocromo oxidase ou dano em DNA mitocondrial. Enquanto muitos anos foram dedicados para a “hipótese amiloide”, diversas outras propostas continuam sendo causas possíveis para a instalação e progressão da DA, como estresse oxidativo, hiperfosforilação da tau, príon e causas ambientais (revisado em SWERDLOW et al., 2010). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), por exemplo, parece estar envolvida no começo e manutenção do ciclo degenerativo da DA, agravando o dano de DNA mitocondrial e alterando outros complexos da cadeia de transporte de elétrons, o que leva a um aumento na produção de EROs (revisado por PATTEN et al., 2010).

Comprometimento de aprendizagem e memória pode estar associado a alterações da sinalização de Ca^{2+} . Os oligômeros de beta-amiloide aumentam a entrada de Ca^{2+} nas células e mais Ca^{2+} é bombeado para dentro do retículo endoplasmático. Isso contribui para um aumento na sensibilidade dos receptores de rianodina (RyR) que, por sua vez, liberam mais Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares. Existem evidências indicando que várias mutações relacionadas com a DA podem induzir alterações na sinalização de Ca^{2+} . No entanto, a questão do que ocorre primeiro, a ativação da via amiloidogênica ou as alterações na sinalização de Ca^{2+} , ainda permanece em aberto (revisado em BERRIDGE, 2010).

A proteína associada a microtúbulo Tau se acumula no estado anormalmente hiperfosforilado formando depósitos filamentosos intracelulares em diversas doenças neurodegenerativas que causam demência. Essas doenças são coletivamente conhecidas como Taupatias. Essa família de demências inclui a DA, adultos com Síndrome de Down, demência frontotemporal com Parkinsonismo associada ao cromossomo 17, esclerose

amiotrófica lateral, degeneração cortical basal, demência pugilística e a Doença de Pick (IQBAL et al., 2010).

Embora apresentem manifestações fenotípicas diversas, disfunção e degeneração encefálica, essas Taupatias estão associadas à acumulação progressiva de inclusões filamentosas de tau hiperfosforilada, e essas inclusões, juntamente com a ausência de outras anormalidades neuropatológicas específicas à doença exceto deposição de βA na DA e Síndrome de Down, provêm evidência que indica papel da Tau no início e/ou progressão da doença (IQBAL et al., 1998).

A Tau é a principal proteína associada a microtúbulo. In vitro, a Tau promove a conexão da tubulina nos microtúbulos e estabiliza a estrutura do microtúbulo (DEVRED et al., 2010). A grande maioria das proteínas axonais é sintetizada no corpo celular do neurônio e transportada através do axônio pelos caminhos de microtúbulos. O transporte axonal ocorre por toda vida de um neurônio e é essencial para seu crescimento e sobrevivência. Os microtúbulos repousam ao longo do eixo do axônio se constituindo na principal via do citoesqueleto para transporte. Nos neurônios de pacientes com DA, acredita-se que o sistema de microtúbulos se encontre rompido, e o transporte axonal esteja interrompido, impedindo que vesículas alcancem as sinapses e, de forma vagarosa e persistente, as sinapses degeneram, processo esse associado com degeneração retrógrada (ALEJANDRA et al., 2010; IQBAL et al., 2010).

O nível de fosforilação proteica é controlado pelas ações opostas de proteínas quinases e fosfatases. Vários trabalhos indicam alteração na expressão e/ou atividade de proteínas quinases e fosfatases no encéfalo de pacientes com DA (Quadro 1). Proteínas quinases como a glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), P25/Quinase dependente de ciclina (Cdk5) e Proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) apresentam expressão e/ou atividade aumentadas, enquanto atividade reduzida foi encontrada para proteínas fosfatases (PPs) como PP1, PP2A e PP5 em encéfalos acometidos pela DA. A fosforilação anormal de proteínas pode contribuir para a progressão da DA através da modificação de substratos em diversas funções como atividade enzimática, localização subcelular, acoplamento de ligantes, interação com outras proteínas, além de outras propriedades (CHUNG, 2009).

Quadro 1 - Resumo das alterações de expressão e/ou atividade de proteínas quinases e proteínas fosfatases na DA

Proteína	Expressão e/ou atividade na DA	Referências
Proteínas Quinases		
GSK3 β	Aumentada	Hye et al. (2009), Leroy, Yilmaz e Brion (2007), Pei et al. (1997), Swatton et al. (2004)
P25/Cdk5	Aumentada	Swatton et al. (2007), Patrick et al. (1999), Tandon et al. (2003)
Dyrk1A	Aumentada	Dowjat et al. (2007), Kimura et al. (2007), Ryoo et al. (2008)
ERK $\frac{1}{2}$	Aumentada	Swatton et al. (2004), Zhu et al. (2002), Pei et al. (2002)
JNK	Aumentada	Swatton et al. (2004), Zhu et al. (2003), Otth et al. (2003)
p38	Aumentada	Swatton et al. (2004), Johnson e Bailey (2003)
CKI	Aumentada	Yasojima et al. (2000)
Akt/PKB	Aumentada	Pei et al. (2003), Rickle et al. (2004), Griffin et al. (2005)
PKA	Diminuída	Liang et al. (2007), Kim et al. (2001)
PKC	Diminuída	Wang et al. (2008), Buxbaum et al (1990)
Proteína Fosfatases		
PP1	Diminuída	Gong et al. (1993)
PP2A	Diminuída	Gong et al. (1993), Liu et al. (2005a), Vogelsberg-Ragaglia et al. (2001)
PP5	Diminuída	Liu et al. (2005a), Liu et al. (2005b)
PP2B (calcineurina)	Aumentada	Liu et al. (2005b), Liu et al. (2005c)
Cdc25A	Aumentada	Ding et al. (2000)
Cdc25B	Aumentada	Vincent et al. (2001)
PTEN	Diminuída	Griffin et al (2005), Rickle et al. (2006)

Fonte: Adaptado de Chung, 2009

Atualmente, tem se dado maior atenção ao papel da GSK3 como sendo a provável proteína responsável pela hiperfosforilação da proteína Tau, principalmente devido à tendência em se acreditar que a DA esporádica esteja relacionada com a Diabetes mellitus (DM), propondo-se que a neurodegeneração seja efeito da resistência neuronal à insulina (DE LA MONTE; WANDS, 2005; GASPARINI et al., 2002; HOYER et al., 2004; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2006). De fato, a insulina aumenta a atividade da proteína quinase Akt/PKB que por sua vez inibe a GSK3, regulando negativamente a fosforilação de seus substratos (dentre os quais a proteína Tau) (RATAN; SAMANTHA; JESUS, 2004). Assim sendo, o centro da cascata de neurodegeneração seria desencadeada pela resistência neuronal à insulina, provocando a morte do neurônio pela falta de responsividade ao fator neurotrófico

(insulina), deficiência no metabolismo de energia e possivelmente inibição de expressão gênica responsiva à insulina (DE LA MONTE, 2009).

Embora a DA seja multifatorial e, mesmo na presença de diversas hipóteses, a principal etiologia ainda seja desconhecida, esse trabalho foca no papel em que a insulina pode desempenhar como uma possível causa da DA. Evidências moleculares permitiram pressuposições que indicam que o processamento da APP pode sofrer influência da insulina e a sinalização de seu receptor tirosina quinase (GASPARINI et al., 2011; RIVERA et al., 2005) e que a insulina pode regular a fosforilação da proteína Tau através do controle da atividade da GSK3- β (HONG et al., 1997; MANDELKOW et al., 1992). Além disso, estudos funcionais mostraram diminuições tanto na mobilização de glicose quanto no metabolismo energético precedendo ou acompanhando os estágios iniciais dos comprometimentos cognitivos na DA (HOYER, 1998). Consequentemente, déficits no metabolismo de glicose e da sinalização intracelular de insulina foram propostos como uma provável etiologia da DA.

Resumidamente, a insulina é bem conhecida por seu envolvimento na regulação do metabolismo de glicose somente nos tecidos periféricos. No entanto, esse hormônio também pode alterar diversas funções encefálicas incluindo cognição, memória e plasticidade sináptica através de vias de sinalização associadas ao complexo insulina/receptor tirosina quinase. A insulina liga-se à subunidade α extracelular de seu receptor (IR), o que resulta na ativação da subunidade intracelular β e sua decorrente auto fosforilação. Uma vez ativado, o IR fosforila diversos substratos intracelulares, incluindo uma família de proteínas conhecida como substrato para IR (IRS). Então, a fosforilação de alvos intracelulares leva ao recrutamento e ativação de diversas proteínas e a iniciação de muitas cascatas de sinalização, dentre as quais as mais importantes são a via da fosfoinositídeo 3 quinase (PI3K) e a cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (JOHNSTON; PIROLA; VAN OBBERGHEN, 2003). A ativação da via da PI3K, por sua vez, induz a ativação da serina treonina quinase Akt (também conhecida como PKB), promovendo sobrevivência neuronal ao inativar diretamente a maquinaria pró-apoptótica (VAN DER HEIDE; RAMAKERS; SMIDT, 2006).

Além disso, PI3K / Akt ativado fosforila e inibe as duas formas citosólicas da GSK3 (CROSS et al., 1995). Sabe-se que a GSK3 controla a formação de peptídeos de β A, dessa

forma, a insulina consegue regular o desenvolvimento de peptídeos solúveis de APP através de sinalização dependente de PI3K (SOLANO et al., 2000).

1.3 Metabolismo Encefálico na DA e o Modelo da STZ

Diversos estudos confirmaram a diminuição do metabolismo encefálico precedente à deterioração das funções cognitivas, sugerindo que a deficiência energética é uma das características reversíveis mais precoces da DA (revisado em HOYER, 1998). Anormalidades predominantes no metabolismo encefálico de glicose e seu controle pela sinalização neuronal de insulina foram encontrados na DA esporádica (DAE) (FROLICH et al., 1998; HOYER et al., 1991; HOYER, 2002, 2004), levando à hipótese que a DAE funcionaria como uma Diabetes Mellitus tipo II encefálica (HOYER, 1998). Uma incompatibilidade entre a ação da insulina e a função do próprio IR, incluindo vias intracelulares, foi proposta no envolvimento da disfunção do sistema de insulina encefálica na DAE (SALKOVIC-PETRISIC; LACKOVIC, 2006).

Considerando a presença de insulina e IR no encéfalo, um modelo experimental em ratos foi desenvolvido usando estreptozotocina (STZ) para induzir disfunção do sistema de insulina encefálico. A STZ (uma glicosaina derivada de nitrosuréia) é uma droga seletivamente tóxica às células B pancreáticas, induzindo assim Diabetes Tipo I, mas também é utilizada para induzir Diabetes Insulino-Independente (tipo II) em animais, após administração intravenosa ou intraperitoneal em ratos (SZKUDELSKI, 2001). A injeção intracerebroventricular (icv) de STZ em baixas doses não altera, no entanto, os níveis plasmáticos de glicose e não induz DM, mas altera o metabolismo de glicose encefálico (SALKOVIC-PETRISIC et al., 2006). Considerando os papéis importantes da insulina no encéfalo, e que a deficiência na sinalização de insulina está relacionada tanto à DA quanto à DM, a injeção icv de STZ é considerada por muitos autores como um modelo da DAE (BIESSELS; KAPPELLE, 2005; HENNEBERG; HOYER, 1995; HOYER, 2003; HOYER et al., 2004; SALKOVIC-PETRISIC et al., 2006).

A STZ é uma droga cuja toxicidade se dá basicamente por dois mecanismos primários (Figura 1). O primeiro deles é a doação de radical óxido nítrico (NO), podendo provocar alterações no estado nitro-oxidativo da célula. Outro mecanismo de toxicidade é a metilação

direta de bases nitrogenadas do DNA, podendo provocar um distúrbio no equilíbrio energético da célula por consumo de ATP e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LENZEN, 2008; SZKUDELSKI, 2001). Não há, no entanto, nenhum mecanismo descrito que explique a ação da STZ em doses subtóxicas para promoção de resistência insulínica.

Periféricamente, a toxicidade da STZ se inicia quando a droga é internalizada pelas células B pancreáticas por intermédio do transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2) e induz morte celular por alquilação de DNA e ativação da poli-ADP-ribosilação. Como a STZ é um doador de óxido nítrico (NO), a participação do NO no efeito citotóxico da STZ também foi observada, bem como a geração de espécies reativas de oxigênio, que também contribuem para a fragmentação do DNA e evocam outras ações deletérias nas células. A ação da STZ na mitocôndria resulta na formação de superóxido, inibição do ciclo do ácido tricarboxílico e diminuição substancial do consumo de oxigênio pela mitocôndria, limitando fortemente a produção de ATP mitocondrial (SZKUDELSKI, 2001). O mecanismo de ação da droga no sistema nervoso central, no entanto, ainda não foi elucidado.

Figura 1 - Mecanismo proposto de dano oxidativo e desbalanço energético provocado pela STZ

A doação espontânea do NO provoca inibição da aconitase e consequente diminuição do ATP mitocondrial (MIT ATP), elevando as concentrações de AMP. O AMP é substrato para a xantina oxidase (XOD), que passa a ter atividade aumentada e, por consequência, aumenta a produção de radicais superóxido.

Achados moleculares e comportamentais que seguem a perturbação do metabolismo de glicose e sinalização de insulina parecem mimetizar a DA, ao menos em alguns aspectos. A administração icv de STZ vem sendo associada, em animais, a mudanças morfológicas, moleculares e comportamentais comparáveis à DA. Essas alterações ocorrem algumas semanas após a injeção e perduram por períodos indeterminados. Muitos autores descrevem aumento da expressão de GFAP principalmente em regiões periventriculares e paraventriculares, sugerindo que a função hipocampal alterada pode resultar de uma inervação comprometida e dano direto nessa região (SANTOS et al., 2012; SHOHAM et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, as principais características da DA são a formação de placas senis devido à acumulação de β A e a formação de emaranhados neurofibrilares devido à hiperfosforilação da proteína Tau (KAR et al., 2004). Foi observado que esse modelo aumenta a fosforilação da proteína Tau em diversas regiões do encéfalo do rato (CORREIA et al., 2011; GASPARINI et al., 2002; SANTOS et al., 2012), aumenta a imunoreatividade a marcadores de emaranhados neurofibrilares (DE LA MONTE et al., 2005), e aumenta a expressão do peptídeo β A (DE LA MONTE et al., 2005; SALKOVIC-PETRISIC; HOYER, 2007; SANTOS et al., 2012), embora esses estudos não tenham observado a formação de placas senis.

Dados recentes têm sido bastante consistentes em mostrar os déficits cognitivos, aprendizagem e memória de curto e longo prazo comprometidas no labirinto aquático de Morris, após a administração icv de STZ (GRÜNBLATT et al., 2006; LANNERT; HOYER, 1998; 2006; SANTOS et al., 2012; SHOHAM et al., 2006), que parece ser independente do número de injeções ou da dose de STZ administrada (revisado em SALKOVIC-PETRISIC; HOYER, 2007). Existem, no entanto, alguns estudos que demonstram que doses menores resultam em déficit cognitivo menor (GRÜNBLATT et al., 2006; PRICKAERTSET et al., 2000). A injeção icv de STZ também alterou o padrão de comportamento em outras tarefas de memória, incluindo a esQUIVA passiva e o labirinto em cruz elevado (ISHRAT et al., 2009; VEERENDRA KUMAR; GUPTA, 2003).

Especificamente relacionado à insulina e ao metabolismo de glicose, Duelli (1994) mostrou que após a administração icv de STZ, houve alteração severa na utilização de glicose, e diminuição do metabolismo energético em 17 regiões encefálicas. Plaschke e

Hoyer (1993) mostraram que a atividade das principais enzimas da via glicolítica diminuiu drasticamente após a administração icv de STZ. Tanto o déficit energético quanto a redução na atividade da colina acetiltransferase (ChAT) (BLOKLAND; JOLLES, 1993; HELLWEGET et al. 1992) podem ser a base biológica para a reduzida habilidade de aprendizagem e memória (LANNERT; HOYER, 1998).

A administração central de STZ pode ter seus efeitos restritos a neurônios e neuroglia que expressam GLUT 2. No entanto, a STZ pode alcançar o meio intracelular através de outros transportadores, induzindo efeitos tóxicos generalizados. De fato, a utilização de inibidores de GLUT 2 associada à administração icv de STZ não foi capaz de suprimir o déficit de memória causado pela droga em ratos (GRUNBLATT et al., 2007), o que sugere que a STZ tem ações independentes do GLUT 2.

Propõe-se que a sinalização intracelular de insulina pode ser regulada por EROs. Acredita-se que a ação das EROs possa ser dicotômica (Figura 2). As vias mais influentes no mecanismo de estresse oxidativo são as relacionadas ao NF- κ B, JNK/SAPK, p38 MAPK e PKC (LOPES; SILVA; FORTUNATO, 2008). Porém, sabe-se que agentes oxidantes podem tanto possuir efeitos que mimetizam a ação da insulina, ao facilitar a fosforilação da subunidade β do receptor de insulina e, portanto, sua ativação, quanto também serem capazes de induzir ação insulínica defeituosa (NAVA et al., 2009). Uma das interações viáveis para a conversa entre a sinalização redox e a sinalização de insulina poderiam ser uma família de proteínas fosfatases, as PTPs (proteína tirosina fosfatases), que são moduladas negativa por EROs o que, conseqüentemente, facilita respostas intracelulares dependentes de fosforilação em tirosina, como é o caso da sinalização de insulina (PAPACONSTANTINO, 2009).

Figura 2 - Possíveis interferências na cascata de sinalização de insulina provocadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Em A, o papel facilitador é explicado pela inibição de proteínas fosfatases que normalmente modulam negativamente a via (notar que essas fosfatases também se apresentam com atividade diminuída na DA). Em B, a ativação da cascata da MAP-Kinase provoca inibição do receptor de insulina e seus substratos intracelulares (IRS) pela fosforilação em resíduos de serina e treonina. Além disso, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) danificam os IRS, encaminhando-os à degradação.

Outros modelos têm sido usados na tentativa de induzir DAE, como injeção icv de colchicina (KUMAR et al., 2007) e aplicação subcutânea de longo prazo de corticosterona (HOYER; LANNERT, 2008). Esses autores também observaram alterações histopatológicas, moleculares e comportamentais similares ao que é observado na DA, no entanto ainda há problemas relacionados à utilização desses modelos e estudos mais aprofundados são necessários para investigar seus efeitos.

Como apontado por Salkovic-Petrisic et al. (2011), carregar o gene mutado como um inevitável ponto de partida desde o início faz com que os modelos genéticos de camundongos sejam inapropriados para investigar a causa, instalação e decurso da DA em condições não associadas com a mutação do gene da APP.

Estudos mais profundos são necessários para a compreensão total dos efeitos da STZ nas células do sistema nervoso central. De fato, o mecanismo de ação de doses subtóxicas de STZ em neurônios ainda não é devidamente elucidado. Embora sua ação tóxica seja bem

conhecida, sua utilização como modelo para a DAE por indução de disfunção insulínica ainda carece de maiores explicações.

A hipótese de que os efeitos subtóxicos provocados pela STZ, dentro os quais as alterações na sinalização e responsividade à insulina, bem como modificação de marcadores biomoleculares relacionados à DA (hiperfosforilação de Tau e β -amilóide), sejam causados por EROs encontra respaldo nos trabalhos que indicam a produção destas espécies como uma das primeiras formas de toxicidade da droga.

Além dos trabalhos que estudam o mecanismo de ação da STZ, vários outros apontam a possibilidade do distúrbio da sinalização intracelular de insulina por agentes oxidantes. Nesse sentido, o estudo dos mecanismos intracelulares desencadeados por uma concentração subtóxica de STZ pode contribuir na elucidação de novos alvos terapêuticos para a DA.

1.4 Objetivos

O objetivo deste trabalho é determinar as alterações induzidas por concentrações subtóxicas de STZ em neurônios da linhagem Neuro2A na produção intracelular de EROs, procurando relacionar o estado redox da célula com a atividade da cascata associada ao receptor de insulina (PI3K-Akt) através da verificação o estado de fosforilação dos substratos da via.

Além da produção intracelular de EROs e capacidade de doação espontânea de NO pela droga, este estudo pretende averiguar a capacidade de indução de resistência insulínica pela STZ nas células utilizadas, bem como a influência desse fenômeno na indução de neuritogênese por tratamento com NGF.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultivo de Células

Foi utilizada neste estudo a linhagem celular Neuro-2a (Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ, Rio de Janeiro, RJ), um clone derivado de um neuroblastoma espontâneo de camundongo. Essas células produzem grandes quantidades de proteínas do microtúbulo e da enzima de degradação da acetilcolina, a acetilcolinesterase, e têm sido extensivamente utilizadas como modelo neuronal *in vitro* em estudos com diversos agentes indutores de toxicidade e morte celular gerados por estresse oxidativo.

As células foram cultivadas em meio Dulbecco MEM (DMEM; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10 U.I./ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina e 10% de SFB, 2 mM de glutamina e 5,6 mM de glicose, em uma incubadora com atmosfera umidificada a 37°C de 5% de CO₂ por 2 dias antes dos tratamentos com STZ.

O tratamento com estreptozotocina (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) foi feito preparando-se a solução em meio de cultivo imediatamente anterior à utilização.

2.2 Viabilidade Celular

2.2.1 Ensaio de viabilidade celular: redução de formazan colorido (MTT)

O ensaio de MTT foi realizado como descrito por Mosmann (1983) e Hansen, Nielsen e Berg (1989). Este método é baseado na habilidade de células viáveis de converter o sal tetrazolium (MTT) para formazan colorido. A viabilidade das células foi determinada pela adição de MTT (12 mM) na cultura celular Neuro-2A. Após 2 h e 30 min de incubação a 37 °C, os cristais escuros formados foram dissolvidos adicionando DMSO, e a absorbância (abs) medida por um leitor de microplaca no comprimento de onda de 570 nm.

Os ensaios de redução de MTT foram realizados com quatro concentrações diferentes (0,5; 5,0; 25 e 50 mM) e em diferentes períodos de incubação da droga (1, 2, 24 e 48 horas). Para melhor padronização, esses ensaios foram feitos dissolvendo-se a estreptozotocina em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de SFB (10 ou 1%).

2.2.2 Ensaio de viabilidade celular: liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A morte celular foi avaliada também pela liberação de LDH. A atividade de LDH em sobrenadantes de cultura celular foi observada através de um teste enzimático descrito anteriormente (DECKER; LOHMANN-MATTES, 1988). Foi utilizado um kit de detecção citotóxica (Promega, Madison, EUA) e a quantidade de LDH liberada pelas células foi detectada por um leitor de microplaca no comprimento de onda de 490 nm.

Os ensaios de atividade de LDH foram feitos todos em incubação da droga em meio com soro reduzido (1%), com períodos equivalentes a 1, 2 e 24 horas.

2.3 Medição de Óxido Nítrico por Quimioluminescência

A possibilidade de doação espontânea de óxido nítrico pela STZ foi investigada por quimioluminescência, utilizando-se o Sievers Nitric Oxide Analyzer, NOA (GE Water and Process Technologies, Boulder, CO, USA).

Soluções de 50 mM da droga foram preparadas em meio de cultivo contendo 1% de SFB e congeladas a -80 °C em períodos equivalentes a 15 minutos, 1, 6, 12, 24 e 48 horas após dissolução.

A detecção se baseia na reação do NO com o ozônio (O₃), produzindo dióxido de nitrogênio (NO₂) em um estado excitado e oxigênio molecular. O dióxido de nitrogênio, ao passar de seu estado excitado para o estado relaxado, emite quimioluminescência infravermelha fraca acima de 600 nm.

Todo o nitrito e nitrato presentes na solução são convertidos a NO por reação com solução saturada de cloreto de vanádio (VCl₃, 8 mg/mL) em 0,8 M de HCl. As amostras são injetadas diretamente dentro da câmara onde ocorre a reação de redução do nitrito e nitrato pelo cloreto de vanádio. A temperatura da câmara é mantida constante por fluxos de água. O NO produzido é carregado para a câmara de detecção (onde reagirá com o ozônio) por um fluxo de nitrogênio constante a 100 mL/min. A concentração de NO é calculada comparando-se com uma curva padrão de nitrito ou nitrato de sódio. Para a construção da curva padrão deste trabalho foram utilizadas concentrações crescentes de nitrato de sódio variando de 1 µM a 200 µM.

2.4 Ensaios de Western Blotting

A preparação das células foi baseada no protocolo descrito por Feinstein et al. (1994). As células foram coletadas em PBS gelado e centrifugadas a 2000 g X 5 minutos X 4 °C e o pellet ressuspendido em tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaina 2 µg/mL; PMSF 0,5 mM) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foram adicionados em seguida 10 µL de NP-40 10% com agitação vigorosa, centrifugando-se a 11000 g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante armazenado a -80 °C para posterior dosagem de proteína. O método usado é baseado no descrito por Laemmli, Beguin e Gujer-Kellenberger (1970). As proteínas foram ajustadas na concentração adequada com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de bromophenol blue; pH 6,8) e fervidas por 5 minutos a 95 °C. A dosagem de concentração de proteína foi avaliada através do método de Bradford (BRADFORD et al., 1976) utilizando reagente da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas. A comparação com uma curva padrão de albumina (Bio-Rad Laboratories) forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida 10% [acrilamida/bisacrilamida (5:1), 10% SDS] para que houvesse a separação das proteínas contidas na amostra. Para a eletroforese foi usado um tampão de corrida consistindo em 25 mM de tris-base; 0,192 M de glicina; 0,1% de SDS. A eletroforese foi desenvolvida por volta de 2 horas a 100 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose por aproximadamente 2 horas a 50 V. Para a transferência foi usado tampão contendo 25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 20% de metanol e água bidestilada. Após a transferência, as membranas foram deixadas *overnight* a 4 °C numa solução contendo TBS (100 mM tris-base; 0,9% NaCl e água), 0,5% de leite desnatado e 0,05% de tween 20 para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram lavadas 3 vezes em solução de TTBS (TBS; 0,1% Tween 20) e incubadas com o anticorpo primário diluído em TTBS por 2 horas ou *overnight* sob agitação leve e constante. As membranas foram então

novamente lavadas 3 vezes com TTBS e incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora. A revelação foi feita através do kit de quimioluminescência ECL-Amersham.

2.4.1 Avaliação da cinética de sinalização do receptor de insulina

Para avaliar o perfil de ativação da via PI3K / Akt quando sob o estímulo de 100 nM de insulina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), as células foram semeadas em placas de cultura, cultivadas em meio completo por 24 horas e então mantidas em soro privação (0% SFB) durante outras 24 horas. O estímulo (100 nM de insulina) foi feito em meio igualmente sem soro. As células foram coletadas para blotting em períodos equivalentes a 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após o estímulo. Nos experimentos realizados com estimulação de insulina e coleta de material para blotting em períodos curtos (menos de 1 hora), as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado na própria placa de cultivo, onde também foi feita a lise completa das células.

2.4.2 Acompanhamento do estado de fosforilação da Akt e GSK3- β

Para avaliar o potencial da esteptozotocina em influenciar a cascata de insulina, o estado de fosforilação da Akt e da GSK3- β foram acompanhados em períodos curtos (1, 2 e 3 h) de incubação com diferentes concentrações da droga (0,5 e 5,0 mM), utilizando-se, para tanto, anticorpos primários disponíveis comercialmente anti Akt e anti-p-Akt (Ser 473) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) e anti GSK3- β e anti p-GSK3- α/β (Ser 21/9) (Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA).

Para a averiguação da participação do óxido nítrico doado pela STZ na indução dos efeitos observados, um tratamento conjunto de STZ com 1 mM de Carboxi-PTIO (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foi realizado obedecendo-se os mesmos períodos. Após incubação, as células foram igualmente colhidas para ensaio de western blotting.

2.4.3 Desafio de insulina

O teste funcional da sinalização de insulina foi feito após incubação das células durante 48 horas a concentrações de 0,5 e 5,0 mM de STZ. Após esse período, as células

foram desafiadas com 100 nM de insulina e o material colhido para blotting. Foi feita então a comparação entre os níveis de fosforilação de Akt e GSK3- β entre as células estimuladas com insulina e as células não estimuladas, nos diferentes tratamentos de STZ.

A participação do NO na indução de resistência insulínica pelo tratamento com STZ foi testada fazendo-se tratamento conjunto com 1 mM de carboxi-PTIO (durante as 48 horas do estímulo) e procedendo-se às mesmas etapas de desafio com a insulina e coleta de material para blotting.

2.4.4 Indução de resistência insulínica

Como controle positivo de resistência insulínica foi adaptado protocolo descrito anteriormente por Gupta, Bisht e Dey, 2012. As células depois de semeadas e cultivadas por 24 horas em meio de cultivo completo (10% SFB) foram submetidas a tratamento com meio DMEM sem soro acrescido de 100 nM de insulina durante 48 horas, com troca do meio a cada 12 horas. Ao fim desse período as células foram desafiadas com 100 nM de insulina e, após 10 minutos, o material foi colhido para blotting e o estado fosforilativo da Akt comparado.

2.5 Medição de EROs por Fluorimetria em Citometria de Fluxo

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi escolhido utilizar a sonda fluorescente dihidroetidina (DHE) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), mais específica para superóxido. A DHE é uma sonda permeante que apresenta uma coloração azul no citoplasma da célula. Quando oxidada, ela intercala no DNA da célula, apresentando uma coloração vermelha fluorescente intensa.

A dosagem de espécies reativas de oxigênio pela utilização de DHE foi realizada da seguinte forma. Após tratamento com STZ (1, 2, 3, 6, 24 ou 48 horas), as células foram incubadas com 5 μ M de DHE em meio sem soro durante 30 minutos em incubadora com atmosfera umidificada a 37 °C de 5% de CO₂. Após esse período, ao abrigo da luz, as células foram lavadas duas vezes com PBS (NaCl 8g/L, KCl 0,2g/L, Na₂HPO₄ 2,16g/L, KH₂PO₄ 0,2g/L) gelado e descoladas da placa de cultivo por digestão com tripsina (Gibco, Life Technologies Corporation) 0,05% durante 5 min, depois dos quais a tripsina foi neutralizada por adição de

meio contendo 10% de SFB. As células foram colhidas em microtubos de centrifugação e submetidas a 2000 g durante 10 minutos, ressuspensas em PBS gelado e novamente centrifugadas para lavagem e, por fim, ressuspensas em PBS gelado + 2% de FBS.

A suspensão de células passou por *cell strainer* de 70 μ m e colhidas em tubo para citômetro, onde foram mantidas em gelo e ao abrigo da luz até a passagem no citômetro, e imediatamente levadas para o aparelho.

Para a análise no citômetro, foi utilizado o canal FL-2 para a detecção do PE. A análise foi determinada por citometria de fluxo (citômetro FACSCanto II, BD Biosciences) dentro dos gates FSC e SSC. Pelo menos 10 000 eventos foram obtidos de cada amostra e as células foram analisadas usando o software *FlowJo* (Tree Star, inc St, Ashland, OR, USA)

2.6 Ensaio de Imunofluorescência

Após cultivo em lamínulas ($1,0 \times 10^4$ células por lamínula redonda de 13 mm), o meio foi retirado e as células lavadas 3X em PBS gelado e fixadas com metanol 100% por 20 minutos a 4 °C. Após esse período as células foram novamente lavadas em PBS e incubadas com soro de bloqueio (PBS + 0,05% Triton X-100 + 5% de soro normal de burro) por duas horas. Foi retirado o excesso de soro de bloqueio e as células incubadas em solução do anticorpo primário (solução de bloqueio + anticorpo primário) overnight. Para as marcações realizadas neste trabalho e avaliação de neuritos, o anticorpo utilizado foi contra α -tubulina (Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA). As células foram então lavadas com solução de bloqueio, incubadas com solução de anticorpo secundário (PBS + Triton X-100 + anticorpo secundário correspondente) durante 2 horas em temperatura ambiente ao abrigo da luz e sob agitação. Após lavagem com PBS, as células foram finalmente incubadas com solução de DAPI feita em PBS + Triton X-100 por 15 minutos, lavadas e as lâminas montadas utilizando glicerol carbonato como meio de montagem.

Para a captura das imagens foi utilizado um microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA), máquina Nikon Digital Camera DXM 1200C (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA) e o software de imagem utilizado foi o NIS-Elements Advanced Research 2,30 2006 (Nikon Instrument Inc., Melville, NY, EUA). Foram capturados 6 campos representativos de cada lamínula, todos em objetiva de 40X.

2.6.1 Tratamento com NGF

Para promover neuritogênese, as células foram tratadas com NGF, 10 ng/mL, durante 48 horas em meio contendo 2% de SFB e 1% de soro de cavalo.

3 RESULTADOS

3.1 Viabilidade Celular (MTT)

Os testes de viabilidade celular utilizando MTT foram feitos em duas condições diferentes. Inicialmente o teste foi realizado dissolvendo-se a STZ em meio de cultivo contendo 10% de soro fetal bovino. Foram testadas quatro concentrações diferentes da droga (0,5, 5,0, 25 e 50 mM) e diferentes períodos de incubação.

Para avaliação nos períodos de uma e duas horas foram feitos 3 experimentos independentes, cada qual com um $n = 4$. Os experimentos referentes a 24 horas de incubação foram replicados duas vezes, cada qual com o mesmo número de amostras ($n=4$). Os experimentos referentes a 48 horas foram replicados 4 vezes, também com o mesmo número de amostras ($n=4$).

Em períodos inferiores a 48 horas podemos ver que a menor dose utilizada não apresenta diferença estatística relevante em comparação ao grupo controle. A partir de 48 horas, no entanto, aparentemente existe diminuição na reação de redução do MTT, indicando provavelmente morte celular.

Figura 3 - Efeitos de diversas concentrações de STZ na viabilidade de células Neuro2A avaliada pela redução de MTT

Avaliação feita em diferentes períodos de incubação, na presença de 10% de soro fetal bovino. Os resultados apresentados consideram o grupo controle como 100% de viabilidade. Os resultados destacados representam diferença estatisticamente significativa comparando-se com o grupo controle. (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Tabela 1 - Resultados da análise de variância (ANOVA) referentes ao ensaio de redução de MTT na presença de soro fetal bovino

	1 Hora	2 Horas	24 Horas	48 Horas
CTL vs 0,5mM	-	-	-	$p < 0,001$
CTL vs 5,0mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,001$
CTL vs 25mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
CTL vs 50mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
0,5mM vs 5,0mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,05$
0,5mM vs 25mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
0,5mM vs 50mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
5,0mM vs 25mM	-	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
5,0mM vs 50mM	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
25mM vs 50mM	-	-	$p < 0,001$	-

Os mesmos testes foram realizados utilizando-se meio de cultura com soro reduzido (1%) para a diluição da droga.

Figura 4 - Efeitos de diversas concentrações de STZ na viabilidade de células Neuro2A avaliada pela redução de MTT

Avaliação feita em diferentes períodos de incubação, na ausência de 1% de soro fetal bovino. Os resultados apresentados consideram o grupo controle como 100% de viabilidade. Os resultados destacados representam diferença estatisticamente significativa comparando-se com o grupo controle. (*** = $p < 0,001$)

Os valores obtidos para período de incubação de 2 horas são referentes a 3 experimentos independentes, todos realizados com $n=4$. Já os de 24 horas são referentes a dois experimentos independentes, também com $n=4$ em cada experimento.

Nessas condições podemos perceber que, nos períodos avaliados, concentrações de até 5,0 mM não provocam qualquer alteração na quantidade de MTT reduzido pelas células.

Tabela 2 - Resultados da análise de variância (ANOVA) referentes ao ensaio de redução de MTT na ausência parcial de soro fetal bovino

	2 Horas	24 Horas
CTL vs 0,5mM	-	-
CTL vs 5,0mM	-	-
CTL vs 25mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$
CTL vs 50mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$
0,5mM vs 5,0mM	-	-
0,5mM vs 25mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$
0,5mM vs 50mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$
5,0mM vs 25mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$
5,0mM vs 50mM	$p < 0,001$	$p < 0,001$
25mM vs 50mM	-	$p < 0,001$

3.2 Citotoxicidade (LDH)

Para avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações da droga, foi realizado o ensaio enzimático do LDH. Para este ensaio, As células foram incubadas com solução de cultivo com 1% de soro fetal bovino contendo diferentes concentrações de STZ.

A liberação da enzima no meio de cultura foi avaliada em diferentes períodos de incubação com a droga. Os resultados apresentados na figura 5 indicam a citotoxicidade como porcentagem de células mortas comparadas a um controle positivo equivalente a 100% de morte.

Figura 5 - Efeitos de diversas concentrações de STZ na viabilidade de células Neuro2A

Avaliação feita pela liberação de LDH no meio de cultura, em diferentes períodos de incubação, na presença de 1% de soro fetal bovino. O valor máximo (100% de citotoxicidade) foi avaliado medindo-se a quantidade de atividade da enzima LDH presente no meio de cultura de um lisado de células em número equivalente aos outros grupos. Os resultados destacados representam diferença estatisticamente significativa comparando-se com o grupo controle. (*** = $p < 0,001$)

Todos os valores de citotoxicidade obtidos com os ensaios de atividade de LDH foram alcançados compilando-se os resultados de 3 experimentos independentes, todos com n=4 em cada experimento.

Considerando-se os períodos avaliados, é possível verificar que apenas concentrações iguais ou superiores a 25 mM, presentes no mínimo por um período de 24 horas, apresentam-se citotóxicas às células Neuro2A.

Tabela 3 - Resultados da análise de variância (ANOVA) referentes ao ensaio de citotoxicidade (liberação de LDH)

	1 Hora	2 Horas	24 Horas
CTL vs 0,5mM	-	-	-
CTL vs 5,0mM	-	-	-
CTL vs 25mM	-	-	p < 0,001
CTL vs 50mM	-	-	p < 0,001
0,5mM vs 5,0mM	-	-	-
0,5mM vs 25mM	-	-	p < 0,001
0,5mM vs 50mM	-	-	p < 0,001
5,0mM vs 25mM	-	-	p < 0,001
5,0mM vs 50mM	-	-	p < 0,001
25mM vs 50mM	-	-	p < 0,001

3.3 Doação Espontânea de NO

A doação espontânea de NO no meio de cultura foi avaliada em diferentes períodos de incubação com a droga (15 minutos, 1, 6, 12, 24 e 48 horas). Os resultados apresentados no quadro 2 indicam a concentração de NO presente nas amostras nos respectivos períodos de dissolução

Quadro 2 - Concentrações de NO calculadas em diferentes períodos após dissolução da STZ em meio de cultura

	15 Min	1 Hora	6 Horas	12 Horas	24 Horas	48 Horas
1a	29 980	12,8	6,4	-	-	-
1b	27 530	18,2	4,2	-	-	-
Média	28 755	15,5	5,3	-	-	-
2a	30 230	20,4	2,4	-	-	-
2b	28 540	22,1	1,5	-	-	-
Média	29 385	21,25	1,95	-	-	-
3a	31 430	24,2	3,2	-	-	-
3b	29 790	23,8	1,8	-	-	-
Média	30 610	24	2,5	-	-	-
Média Total	29 583	20,25	3,25	-	-	-

Os valores apresentados referem-se a concentrações em μM , calculadas descontando-se valor obtido com solução sem STZ

A formação de nitrito/nitrato em períodos curtos de dissolução da STZ é extremamente alta. Vemos que em 15 minutos foi detectada uma concentração equivalente a 29,5 mM de nitrito/nitrato no meio de cultura no qual foi diluído 50 mM de STZ. Essa concentração também cai rapidamente (média de 20,25 μM em 1 hora e 3,25 μM em 6 horas) e já não é mais detectável em períodos maiores que seis horas.

3.4 Western Blotting

3.4.1 Estado de fosforilação da Akt e GSK3- β

Com o intuito de averiguar se a STZ é capaz de modular o estado fosforilativo de enzimas relacionadas à sinalização intracelular de insulina, foi feito ensaio de western blotting contra Akt e p-Akt em períodos agudos de incubação de diferentes concentrações da droga.

Para todos os resultados apresentados o n é igual a 4.

É possível verificar que, em uma hora, nenhuma concentração utilizada da droga provocou qualquer alteração no estado de fosforilação da Akt.

Figura 6 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de Akt e sua forma fosforilada uma hora após o estímulo da droga

Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizando pelos controles.

Os mesmos testes foram realizados após duas horas de incubação da droga. Neste caso também o n é igual a 4.

No período de duas horas não houve também qualquer alteração nos níveis de fosforilação da Akt, sugerindo que a droga, nesses períodos e condições não é capaz de alterar a sinalização intracelular de insulina.

Figura 7 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de Akt e sua forma fosforilada duas horas após o estímulo da droga

Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizando pelos controles.

De forma semelhante os mesmos testes foram realizados após três horas de incubação com a STZ. Novamente, foram realizados 4 experimentos independentes e os resultados são apresentados na figura 8.

Figura 8 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de Akt e sua forma fosforilada três horas após o estímulo da droga

Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizando pelos controles.

Como observado, o estado de fosforilação da Akt não é afetado pela STZ, pelo menos em nenhum período analisado. No entanto, para a investigação de inativação da Akt por nitrosilação foram feitos experimentos para avaliação da fosforilação da enzima GSK3- β , substrato da Akt.

Nas figuras 9, 10 e 11 estão representados os resultados de western blotting para a proteína GSK3- β e sua forma fosforilada, em períodos equivalentes a 1, 2 e 3 horas de tratamento com a STZ. Na tabela 4 são apresentados os resultados estatísticos referentes à análise por ANOVA e pós-teste de Tukey.

Para esses experimentos foram escolhidas apenas duas doses de STZ, equivalentes a 0,5 e 5,0 mM.

Figura 9 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de GSK3- β e sua forma fosforilada uma hora após o estímulo da droga

Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizando pelos controles.

Figura 10 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de GSK3- β e sua forma fosforilada duas horas após o estímulo da droga

Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizando pelos controles. Os resultados destacados representam diferença estatisticamente significativa comparando-se com o grupo controle. (* = $p < 0,05$)

Figura 11 - Efeitos de concentrações subtóxicas de STZ na expressão de GSK3- β e sua forma fosforilada três horas após o estímulo da droga

Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizando pelos controles. Os resultados destacados representam diferença estatisticamente significativa comparando-se com o grupo controle. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$)

Tabela 4 - Resultados da análise de variância (ANOVA) referentes à razão de p- GSK3- β / GSK3- β após diferentes períodos de tratamento com estreptozotocina

	1 Hora	2 Horas	3 Horas
CTL vs 0,5mM	-	-	$p < 0,05$
CTL vs 5,0mM	-	$p < 0,05$	$p < 0,01$
0,5mM vs 5,0mM	-	-	-

Embora em 1 hora de tratamento a STZ não seja capaz de alterar o nível de fosforilação da GSK3- β , podemos ver claramente que em períodos maiores ocorre diminuição crescente de fosforilação da enzima. No período equivalente a 3 horas a diferença ocorre para ambas as doses utilizadas no experimento.

A menor fosforilação da GSK3- β no resíduo Ser 9 pode corresponder a uma menor atividade da quinase responsável por sua fosforilação, a Akt. Considerando que os níveis de

fosforilação da Akt não sofreram alterações nos períodos analisados, é possível que a diminuição de sua atividade tenha sido causada por outros mecanismos. Nesse sentido, a nitrosilação da Akt e sua consequente inativação torna-se uma opção viável, visto que a droga é capaz de liberar NO espontaneamente.

Para averiguar a participação do NO nas alterações de fosforilação da GSK3- β pela STZ, os mesmos experimentos foram realizados fazendo tratamento conjunto de STZ com o sequestrante de NO carboxi-PTIO. Os resultados são representados na figura 12.

Figura 12 - Efeito do tratamento simultâneo de STZ e carboxi-PTIO sobre a expressão de p-GSK3- β em diferentes períodos após o estímulo da droga

Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizando pelos controles.

É evidente que a STZ perde sua capacidade de modular a fosforilação da GSK3- β uma vez que o NO é retirado do cenário, sugerindo assim que o radical livre é responsável pela nitrosilação e inativação da Akt.

3.4.2 Cinética da sinalização do receptor de insulina

Esse experimento foi realizado com a finalidade de identificar o pico no qual se tem a maior fosforilação (ativação) da Akt após estímulo com 100 nM de insulina. Após 24 horas de soroprivação, foi feito estímulo com 100 nM de insulina e o estado de fosforilação da proteína Akt atestado em diferentes períodos (5, 10, 15, 20 e 30 minutos após exposição ao hormônio).

Foram feitos três experimentos independentes, cada qual em duplicata. Os resultados estão representados na figura 13 e na tabela 5.

Figura 13- Estado de fosforilação da proteína Akt em diferentes períodos após estímulo com insulina

Células em soroprivação durante 24 horas foram desafiadas com 100nM de insulina e as concentrações de p-Akt foram medidas por Western Blotting 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após o estímulo com o hormônio. Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizados pelos controles. Comparações feitas vs, grupo controle (***) = $p < 0,001$

Tabela 5 - Resultados da análise de variância (ANOVA) referentes à fosforilação da proteína Akt por estímulo de insulina

Nível Descritivo	
CTL vs 5min	p<0,001
CTL vs 10min	p<0,001
CTL vs 15min	p<0,001
CTL vs 20min	-
CTL vs 30min	-
5min vs 10min	p<0,001
5min vs 15min	-
5min vs 20min	p<0,001
5min vs 30min	p<0,001
10min vs 15min	p<0,001
10min vs 20min	p<0,001
10min vs 30min	p<0,001
15min vs 20min	p<0,001
15min vs 30min	p<0,001
20min vs 30min	-

Com base nesse experimento foi possível identificar que o melhor período para a coleta do material após o estímulo com insulina, para as células Neuro-2A cultivadas nessas condições, é de 10 minutos.

3.4.3 Desafio de insulina

A sensibilidade à insulina só pode ser testada fazendo-se um ensaio funcional do receptor de insulina e da maquinaria intracelular necessária para o encadeamento do sinal. Para tanto, as células foram submetidas a um tratamento com estreptozotocina por um período equivalente a 48 horas, período durante o qual ficaram privadas parcialmente de soro (1% SFB).

Após esse período, um grupo foi estimulado com insulina, enquanto outro grupo permaneceu nas mesmas condições. O material colhido foi analisado com relação à concentração de Akt fosforilada.

O n para esses experimentos foi igual a 4.

Figura 14 - Efeitos de concentrações subtóxicas de estreptozotocina sobre a responsividade à insulina

Células tratadas durante 48 horas com estreptozotocina em soroprivação arcial (1% SFB) foram desafiadas com 100nM de insulina e as concentrações de Akt e p-Akt foram medidas por Western Blotting 10 minutos após o estímulo com o hormônio. Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizados pelos controles. (**=p<0,01)

A responsividade à insulina é verificada comparando-se o grupo não estimulado com insulina (-) com o seu respectivo grupo estimulado (+). Como podemos ver na relação p-Akt / Akt do grupo controle (CTL) e do grupo tratado com 0,5 mM de STZ, o estímulo com 100 nM de insulina é capaz de provocar aumento na concentração de Akt fosforilada dentro de 10 minutos de estímulo. Não houve, no entanto, diferença estatística entre o grupo estimulado e o grupo não estimulado das células tratadas com 5,0 mM de STZ o que poderia indicar que esse tratamento provoca diminuição da sensibilidade à insulina. No entanto, não houve diferença entre o grupo 0,5mM (+) e o grupo CTL (+).

Tabela 6 - Resultados da análise de variância (ANOVA) referentes à razão de fosforilação nos diferentes grupos de desafio à insulina

	p-Akt	Akt	p-Akt / Akt
CTL- vs CTL+	-	-	p<0,01
0,5mM- vs 0,5mM+	p<0,01	-	p<0,01
5,0mM- vs 0,5mM+	-	-	-

Igualmente, para avaliar a participação do NO na indução desse fenômeno, tratamento conjunto de STZ e carboxi-PTIO foi realizado e, ao final de 48 horas, feito desafio à insulina e material colhido para blotting, novamente avaliando o estado de fosforilação da Akt como parâmetro de respinsividade ao hormônio.

Os resultados apresentados na figura 15 e na tabela 7 correspondem a análise por ANOVA de resultados de 6 experimentos independentes.

Figura 15 - Efeitos de tratamento conjunto de STZ e carboxi-PTIO sobre a responsividade à insulina

Células tratadas durante 48 horas com STZ em soroprivação arcial (1% SFB) e 1mM de carboxi-PTIO foram desafiadas com 100nM de insulina e as concentrações de Akt e p-Akt foram medidas por Western Blotting 10 minutos após o estímulo com o hormônio. Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizados pelos controles. (**=p<0,01)

Tabela 7 - Resultados da análise de variância (ANOVA) referentes à razão de fosforilação nos diferentes grupos de desafio à insulina em tratamento conjunto de STZ e carboxi-PTIO

	p-Akt	Akt	p-Akt / Akt
CTL- vs CTL+	p<0,01	-	p<0,001
0,5mM-- vs 0,5mM+	-	-	-
5,0mM-- vs 0,5mM+	-	-	-

Também no processo de indução de resistência insulínica podemos ver que o NO liberado espontaneamente pela STZ desempenha papel crucial nesse processo. Sua inativação por sequestro pela carboxi-PTIO é capaz de reverter o fenômeno de indução de resistência insulínica, demonstrando que o NO desempenha uma função importante na resistência à insulina induzida pela STZ.

3.4.4 Indução de resistência insulínica

Para uso como controle positivo nos experimentos de imunofluorescência, foi necessária a padronização de um tratamento que induzisse apenas resistência insulínica. Para tanto, as células foram tratadas por 48 horas em meio sem soro na presença de 100 nM de insulina. Após esse período foi feito o desafio ao hormônio e a responsividade medida com avaliação da fosforilação da proteína Akt. Os resultados estão representados na figura 16.

Para esses resultados foram realizados dois experimentos independentes, cada um em triplicata.

O sucesso do tratamento se mostra ao compararmos, dentro do grupo cronicamente tratado com insulina, as células estimuladas com insulina com as células não estimuladas. Percebe-se que não há diferença estatística na fosforilação da Akt entre esses grupos, indicando falta de responsividade dessas células ao hormônio.

Figura 16 - Efeitos do tratamento crônico com 100nM de insulina sobre a responsividade ao hormônio

Células tratadas durante 48 horas com 100nM de insulina em soroprivação, com meio trocado de 12 em 12 horas, foram desafiadas com 100nM de insulina e a forma fosforilada da Akt foi medida por Western Blotting 10 minutos após o estímulo com o hormônio. Os valores estão apresentados como densidade óptica relativa, normalizados pelos controles. (***) = $p < 0,001$

3.5 Avaliação de EROs por DHE e Citometria de Fluxo

A figura 17 (painéis A, B e C) mostra a seleção das populações para a análise da fluorescência. Em A é selecionada a população de células cujo tamanho e complexidade são mais representativos e assim são excluídos debris e artefatos. Em B, a comparação entre altura (FSC-H) e área (FSC-A) dos eventos permite que sejam excluídos *doublets* e mantemos então a seleção de eventos correspondentes somente a células únicas e viáveis. Para a construção desses gráficos (figura 19, painéis A, B e C) foram utilizadas células Neuro2-A não

tratadas com STZ nem marcadas com DHE. Os painéis D a I são *dot plots* dos diversos grupos analisados marcados com DHE (Controle, 1, 2, 6, 24 e 48 horas de STZ, respectivamente).

Figura 17 - Efeitos morfológicos do tratamento de STZ em diversos tempos de incubação sobre células Neuro2-A

Em A temos a seleção de células viáveis, em B a exclusão de *doublets* e em C a exclusão da auto fluorescência das células Neuro2-A. Em D-I estão representados os tratamentos (Controle, 1, 2, 6, 24 e 48 horas de STZ 5,0mM, respectivamente)

Na figura 18 podemos ver os histogramas das intensidades de fluorescência para os diferentes tratamentos utilizados. Em A está representado o resultado de um grupo controle (foram feitos grupos controles para cada período de incubação com a STZ, é representado somente o grupo controle de 1 hora de incubação aqui), em B o grupo tratado com STZ por 1 hora, em C 2 horas de tratamento, em D 6 horas, E 24 horas e F 48 horas.

Figura 18 - Níveis de fluorescência de marcação com DHE após tratamento de estreptozotocina em diferentes tempos de incubação com a droga

A – controle 1 hora; B – STZ 1 hora; C – STZ 2 horas; D – STZ 6 horas; E – STZ 24 horas; F – STZ 48 horas.

Figura 19 - Médias de fluorescência do DHE em diferentes períodos de tratamento com STZ.

*** = $p < 0,001$

Como podemos ver, a partir de 6 horas já é possível ver um desvio para a direita na intensidade de fluorescência, indicando que a partir desse período há formação de espécies reativas de oxigênio. A fluorescência (e a presença de EROs) aumenta gradativamente até as 48 horas. A figura 19 resume as médias de fluorescência para cada grupo e as diferenças estatísticas estão representadas na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da análise de variância (ANOVA) referentes às médias de intensidade de fluorescência de DHE em diferentes tempos de tratamento com estreptozotocina

	Nível Descritivo
CTL 6h vs 5,0mM 6h	p<0,001
CTL 24h vs 5,0mM 24h	p<0,001
CTL 48h vs 5,0mM 48h	p<0,001
5,0mM 6h vs 5,0mM 24h	p<0,001
5,0mM 6h vs 5,0mM 48h	p<0,001
5,0mM 24h vs 5,0mM 48h	p<0,001

3.6 Indução de Neuritogênese e Imunofluorescência

Considerando a neuritogênese um processo importante para a formação e consolidação de memória, foi testada a habilidade da STZ em impedir a neuritogênese induzida por tratamento com NGF (10 ng/mL, 48 horas, em meio com 2% de SFB e 1% de soro de cavalo). A marcação para a avaliação dos neuritos foi feita com anticorpo anti α -tubulina.

Todas as células foram semeadas em densidade igual, mantidas 24 horas em meio DMEN completo com 10% de SFB. Após esse período, as células do grupo controle foram mantidas por 2 dias em meio contendo 1% de SFB e outros 2 dias em meio contendo 2% de SFB e 1% de soro de cavalo (20 A-C). As células do grupo NGF foram mantidas 2 dias em meio contendo 1% de SFB e outros 2 dias em meio contendo 2% SFB + 1% de soro de cavalo + 10 ng/mL de NGF (figura 20 D-F). O grupo STZ + NGF foi mantido 2 dias em meio contendo 1% de SFB + 5 mM de STZ e depois mais 2 dias nas condições de diferenciação com NGF (figura 20 G-I). Por fim, o grupo INS + NGF foi deixado 2 dias em meio sem soro + 100 nM de insulina (com troca do meio a cada 12 horas) e, após esse período, submetido às condições de diferenciação com NGF (figura 20 J-L).

Figura 20 - Fotomicrografias das células neuro 2A submetidas a imunofluorescência com anticorpo anti α -tubulina

Efeitos de tratamento com NGF 10ng/mL por 48 horas sob células Neuro 2A em diferentes condições. De A a C condições controle, sem NGF, de D a F tratamento com NGF, de G a I tratamento com NGF precedido por tratamento com 5mM de STZ por 48 horas, e J a L tratamento com NGF precedido de tratamento crônico com insulina 100nM por 48 horas.

É possível identificar a formação de neuritos após tratamento com NGF quando comparamos os painéis A, B e C (controle) da figura 20 com os painéis D, E e F (tratamento com NGF). Vemos que tanto um tratamento prévio com STZ (painéis G, H e I) quanto um tratamento crônico com insulina (painéis J, K e L) são capazes de impedir a neuritogênese induzida por NGF.

4 DISCUSSÃO

A STZ é uma toxina cuja estrutura molecular se assemelha bastante à glicose, possuindo como única diferença a substituição da hidroxila no C2 por um grupo metilnitrosouréia, o que possibilita que a STZ tenha acesso ao meio intracelular através de transportadores de glicose (GLUT). Acredita-se que a droga tenha afinidade específica ao transportador de glicose do tipo 2 (GLUT-2) (LELOUP, 1994), o que justifica sua utilização para gerar lesões das células β pancreáticas, criando modelos animais de Diabetes Mellitus tipo I e II (ARULMOZHI; VEERANJANEYULU; BODHANKAR, 2004; VAN DER HEIDE; RAMAKERS; SMIDT, 2006). No entanto, a injeção intracerebroventricular de STZ tem sido relatada como um modelo animal da doença de Alzheimer esporádica (DAE) apropriado (GASPARINI et al., 2002; HONG et al., 1997; SALKOVIC-PETRISIC, 2007) muito embora a distribuição de GLUT-2 no SNC seja discutível.

A expressão de GLUT-2 nas células Neuro-2A não é relatada na literatura. De fato, mais pesquisas sobre o transporte de STZ para dentro dos neurônios ainda precisam ser realizadas. Sabe-se, no entanto, que um tratamento prévio com inibidores de GLUT-2 em ratos posteriormente injetados intracerebroventricularmente com STZ não é capaz de impedir uma deficiência de memória, comparável aos ratos que somente receberam STZ (GRUNBLATT et al., 2007). Isso sugere que a STZ pode desencadear respostas intracelulares independente da expressão de GLUT-2.

Considerando os mecanismos de ação da droga, a doação espontânea de NO pode ter um papel fundamental em sua toxicidade. Embora a doação espontânea de NO não tenha sido reportada na literatura, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, alguns trabalhos com animais reportam que a utilização de sequestrantes de NO seriam capazes de impedir a toxicidade da droga sobre as células β pancreáticas.

Van Dyke et al. (2008) mostram que a administração intravenosa concomitante de concentrações equimolares de STZ e carboxi-PTIO não é capaz de induzir morte das células β pancreáticas.

A carboxi-PTIO é um sequestrante de NO solúvel em água e permeante a células. É capaz de oxidar radicais NO a nitrito em uma reação equimolar representada na figura 21.

Figura 21 - Reação proposta para a oxidação do NO pela carboxi-PTIO

Embora a carboxi-PTIO seja uma droga capaz de difundir livremente pelas membranas celulares, é plausível dizer que, no trabalho de Van Dyke et al. (2008), as concentrações de STZ e carboxi-PTIO no interior das células B pancreáticas, diferia drasticamente. Isso porque a STZ é uma droga que ganha o ambiente intracelular exclusivamente através de transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT-2), expressos quase que unicamente nas células em questão. Enquanto a droga diabetogênica se concentraria nas células B, a carboxi-PTIO se difundiria por todas as células do animal. É possível, portanto, imaginar que a atividade sequestrante da carboxi-PTIO se dê em tempo anterior à incorporação da STZ às células B, o que poderia indicar que a droga, de fato, é capaz de liberar NO espontaneamente.

Em experimento semelhante, Durán-Reyes et al. (2004) mostram que, em condições *in vitro*, o tratamento com luz ultravioleta é capaz de aumentar a liberação de NO de uma solução de STZ. Ora fazendo-se um tratamento prévio com luz ultravioleta ora utilizando carboxi-PTIO, esse trabalho também indica a participação essencial do NO no efeito diabetogênico da STZ.

Os resultados referentes à viabilidade celular, especialmente os resultados de redução de MTT em meio com presença de soro fetal bovino, podem indicar um fato interessante. É possível que, como evidenciado nas doses de 0,5 mM e 5,0 mM, estejamos presenciando a ação de dois processos degenerativos diferentes. Um deles é o que vemos nos períodos agudos de 1 e 2 horas, período no qual há grande morte de células nas doses maiores. Esse efeito muito provavelmente deve-se à ação tóxica da droga, e pouco pode se relacionar com algum processo fisiopatológico da DA. No entanto, é possível verificar outro pico de morte às 48 horas, podendo aí ser devido a disfunções intracelulares que podem guardar alguma relação com a DAE.

De qualquer forma, nos ensaios de MTT realizados com meio de cultivo com soro reduzido (1%), houve uma grande diferença nos resultados. Nessa situação, as mesmas concentrações de droga foram incapazes de provocar tanta morte nos mesmos períodos agudos. É possível que a estabilidade da droga esteja alterada no meio com soro e permita maior doação de NO, o que explicaria a maior morte nesse caso.

Comparando-se os resultados de MTT e LDH nas mesmas condições de cultivo (meio de cultura com concentração reduzida de soro), a discrepância entre os valores obtidos para a viabilidade celular por cada método pode ter duas possíveis causas.

Uma possível explicação é que a menor viabilidade observada no MTT em uma e duas horas nas doses de 25 e 50 mM ainda não se reflita na ruptura da integridade de membrana e consequente liberação de LDH no meio. Para a comprovação dessa hipótese deveríamos averiguar a atividade de LDH no meio de cultivo em períodos superiores a 2 horas (3 ou 4 horas, por exemplo).

Outra possível explicação reside no mecanismo de redução do MTT em células viáveis. Considerando-se a necessidade de uma mitocôndria funcional (mais especificamente de uma cadeia respiratória funcional) para que haja a redução do MTT (LIU et al., 1997), é possível que o menor sinal de MTT reduzido encontrado nos períodos mais curtos seja devido a alterações metabólicas provocadas pela droga. De fato, o NO é capaz de provocar inibição reversível da citocromo c oxidase, acarretando em uma diminuição no consumo de oxigênio e metabolismo energético (GUIX et al., 2005).

Quando ligado à citocromo c oxidase, o NO é capaz de induzir a formação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) na mitocôndria e peroxinitrito ($ONOO^-$), o que pode inibir ou danificar os complexos mitocondriais I, II, IV e V, a aconitase, a creatina quinase, membrana mitocondrial, DNA mitocondrial e a SOD mitocondrial, e induzir liberação de Ca^{2+} , permeabilidade transiente, liberação do citocromo c e inchaço mitocondrial (BROWN, 1999).

A capacidade da STZ em alterar a sinalização de insulina em períodos agudos é um resultado novo ainda não abordado na literatura. Neste trabalho foram acompanhadas possíveis alterações em períodos até 3 horas após incubação com a droga.

Em nenhum desses períodos avaliados foi possível identificar alterações na fosforilação da Akt. No entanto, quando avaliamos o estado de fosforilação da proteína GSK3- β , uma etapa abaixo da Akt, podemos perceber um efeito interessante. Enquanto em

uma hora é impossível verificar qualquer alteração na fosforilação da GSK3- β , em duas e três horas a diferença é crescente.

Como já apresentado, acredita-se que a sinalização de insulina é amplamente regulada por uma sinalização redox (NAVA et al., 2009; PAPACONSTANTINO, 2009). Levando em consideração essa observação, e o fato de que observamos doação espontânea de NO pela droga, postulou-se que o radical livre poderia estar envolvido na modulação do estado fosforilativo da GSK3- β .

Para se avaliar o papel do NO como sendo necessário para a modulação de fosforilação da GSK3- β foram realizados experimentos nos quais as condições foram mantidas, excluindo-se apenas o radical livre através da utilização da carboxi-PTIO. Nesse caso, a STZ perde a capacidade de induzir alterações nos níveis de fosforilação da GSK3- β , o que prova que a formação de NO é necessária para a indução desse fenômeno.

A GSK3- β é uma enzima quinase que participa de diversas vias de sinalização. É, portanto, substrato de diversas outras quinases que alteram sua atividade. Particularmente, a fosforilação em Ser 9 (para a GSK3- β) e Ser 21 (para a GSK3- α) é consequência da atividade da serina quinase Akt, e resulta em sua inativação.

Nesse sentido, a menor fosforilação no resíduo de serina 9 da GSK3- β deveria indicar uma menor atividade da Akt. No entanto, os níveis de fosforilação (que modulam a atividade) da Akt não se alteraram nesses períodos analisados. O cenário montado indica modulação de atividade da Akt por outro processo diferente da fosforilação. A nitrosilação de resíduos de cisteína (S-nitrosilação), portanto, entra como hipótese interessante.

Numajiri et al. (2011) descrevem um fenômeno bastante relevante que relaciona NO e a sinalização de insulina, particularmente o efeito do NO sobre a PTEN (fosfatase homóloga à tensina, responsável pela desfosforilação de PIP₃ em PIP₂, diminuindo a atividade da Akt) e a Akt diretamente. Enquanto concentrações baixas de NO causariam a S-nitrosilação e consequente inativação da PTEN, auxiliando desta forma a fosforilação e ativação da Akt, concentrações maiores de NO causariam S-nitrosilação e inativação da Akt, causando, nesse caso, efeito inverso, inibindo o sinal da cascata abaixo da Akt.

O grupo tiol dos resíduos de cisteína das proteínas pode sofrer uma grande gama de alterações eletrofílicas e oxidativas dependentes de espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio. Através dessas reações, estresse oxidativo e nitrosativo pode alterar a função

dessas proteínas. Embora alterações reversíveis estejam relacionadas a processos associados à manutenção da homeostase, quantidades excessivas de EROs e ERNs podem provocar disfunção proteica irreversível. Nesse sentido, a grande quantidade de NO à qual as células foram submetidas devido ao tratamento com STZ poderia provocar disfunção irreversível da via associada ao receptor de insulina.

De fato, os efeitos da STZ sobre a sinalização de insulina foram revelados nos ensaios de desafio ao hormônio. Após 48 horas de tratamento com a droga, podemos dizer que a sensibilidade à insulina no grupo tratado com 5 mM diminui, a dizer pela relação p-Akt / Akt do grupo estimulado com insulina. A menor fosforilação de Akt após estímulo com insulina demonstra uma responsividade deficiente.

Muito se tem falado a respeito da atividade aumentada da GSK3 como uma possível causa da DA, participando no surgimento de comprometimentos cognitivos, hiperfosforilação da proteína tau e produção aumentada de beta-amiloide (HOOPER; KILLICK; LOVESTONE, 2007). Dessa forma, é possível defender a ideia de que a STZ é capaz de induzir um processo semelhante ao encontrado na DA.

A confirmação da indução de resistência insulínica provocada pela STZ indica que é possível que os efeitos encontrados em modelos *in vivo* se devam de fato à falta de responsividade à insulina. Por algum mecanismo ainda não muito esclarecido a STZ é capaz de induzir resistência insulínica. Confirma-se assim que, tal como em tecidos periféricos, a droga é capaz de induzir um estado de diabetes insulino-independente também em neurônios (no caso, a linhagem Neuro-2A).

Mais uma vez, a participação do NO foi testada com a utilização de carboxi-PTIO. O tratamento conjunto de STZ e carboxi-PTIO foi incapaz de induzir resistência insulínica, indicando que, novamente, o NO apresenta função necessária para o fenômeno de indução de resistência à insulina por tratamento com STZ.

A indução de resistência insulínica por radicais NO é discutida no trabalho de Yasukawa et al. (2005). A S-nitrosilação e consequente inativação da Akt foram observadas tanto em modelos *in vitro* utilizando-se diversos doadores de NO, como também em camundongos obesos diabéticos (*db/db*). Importante ressaltar que a inativação da Akt por nitrosilação foi observada em períodos curtos após incubação com doadores de NO, período no qual a menor atividade da Akt não tem relação alguma com redução da atividade da PI3-

K. Nos camundongos obesos, embora comprovada a inativação direta da Akt por nitrosilação, a capacidade de sua fosforilação após estímulo com insulina é menor, indicando que há menor atividade de elementos acima da Akt participando também no cenário da resistência insulínica.

Também no caso do tratamento de 48 horas com STZ é evidente que outro fenômeno além da inativação direta da Akt por nitrosilação está ocorrendo, uma vez que a capacidade da Akt em ser fosforilada está alterada. No entanto, os resultados dos experimentos com a carboxi-PTIO indicam que o NO é um elemento necessário (não fundamentalmente suficiente) para a indução desse fenômeno.

Outro trabalho de Van Dyke et al. (2010) mostra a importância do NO na fisiopatologia da diabetes também utilizando para isso a carboxi-PTIO. O NO e a carboxi-PTIO têm sido muito estudados em diversos processos fisiopatológicos. A carboxi-PTIO, nesse sentido, tem sido utilizada em diversos modelos cumprindo um papel de restauradora de fenômenos degenerativos. Law, Gauthier e Quirion (2001) mostraram que a carboxi-PTIO é capaz de exercer papel protetor contra os efeitos neurotóxicos mediados pela beta-amiloide em uma cultura primária mista de córtex de ratos.

A participação de outras espécies reativas no modelo STZ sempre foi discutida. Como já apontado, a falência energética (por inibição da aconitase pelo óxido nítrico) e o fenômeno de reparo de DNA por poli-ADP-ribosilação (fenômeno esse desencadeado pela metoxilação do DNA) aumentam a concentração intracelular de AMP (SZKUDELSKI, 2001)

As maiores concentrações de AMP culminam na formação de maiores quantidades de hipoxantina, substrato para a xantina oxidase. O AMP é hidrolisado em adenosina, que é metabolizada a ácido úrico (adenosina a inosina, inosina a hipoxantina, hipoxantina a xantina e essa, por fim, a ácido úrico) em um processo cujas duas últimas etapas são realizadas pela xantina oxidase. Ao converter xantina a ácido úrico, a xantina oxidase reduz oxigênio molecular a ânions superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (SZKUDELSKI, 2001).

Com os experimentos realizados com DHE podemos identificar um início de formação de superóxido e outras espécies reativas de oxigênio 6 horas após o início do tratamento com STZ.

Wada e Yagihashi (2004) mostram que a enzima responsável pelo reparo de DNA através da poli-ADP-ribosilação está aumentada 5 a 8 horas após a injeção intravenosa de

altas doses de STZ. É de se esperar que nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, o dano e indução de reparo de DNA sejam fenômenos que se iniciam muito mais rápido se comparados ao início dos mesmos fenômenos em experimentos *in vivo*. Ainda no trabalho de Wada e Yagihashi, foi visto, através da utilização de uma sonda inespecífica para radicais livres, o DCF-DA, que a produção de radicais livres nas células B pancreáticas depende parcialmente do NO produzido pela STZ.

É importante notar aqui que a produção de espécies reativas, no caso estudado, se mostra compatível com a viabilidade celular por algum período. Não podemos descartar a hipótese que essa produção de radicais livres pode ter uma participação na indução do fenômeno de resistência insulínica que a droga consegue promover.

Por fim, com o intuito de investigar as implicações funcionais do tratamento com STZ sob os neurônios, foi proposto então o experimento que envolvia a indução de neuritogênese por tratamento com NGF.

Sabe-se que o NGF desempenha um papel fundamental nos processos de plasticidade hipocampal e aprendizagem (CONNER et al., 2009; WALZ et al., 2005) e o fator de crescimento produz efeitos positivos apenas sob a memória de ratos idosos (MARKOWSKA et al., 1994), e não em ratos jovens.

O resultado que indica que o tratamento prévio com STZ é capaz de reduzir a neuritogênese induzida por NGF pode sugerir uma possível explicação para os resultados de déficit cognitivo descrito pelos diversos autores que utilizam a injeção icv de STZ como modelo animal da DA.

A comparação com o grupo resistente à insulina nos traz mais informações a respeito dos mecanismos moleculares associados ao modelo de DA induzido pela STZ. Mostra-se aí que não somente a resistência insulínica é capaz de impedir a neuritogênese induzida por NGF, como pode também indicar que é através desse mecanismo (indução de resistência insulínica) que a STZ exerce seus efeitos deletérios sob a cognição dos animais.

O receptor de maior afinidade para o NGF (receptor TrkA) é um receptor tirosina quinase assim como o receptor de insulina. O fenômeno de resistência cruzada mostrado nesse trabalho pode ser explicado devido ao compartilhamento da via da PI3K / Akt por ambos os receptores.

De fato, já é muito bem descrita a importância da via PI3K / Akt na indução de neuritogênese em modelos in vitro (LÓPES-CARBALLO et al., 2002) e in vivo (HASHIKAWA-HOBARA et al., 2011).

Aparentemente, a neuritogênese induzida por NGF é dependente da ativação da Akt e consequente inativação da GSK-3 β (SHEN, 2011; ZHOU et al., 2004). Temos nesse trabalho o indício de que o tratamento com 5,0 mM de STZ é capaz de impedir a fosforilação (e consequente inativação) da GSK-3 β .

O fato da resistência insulínica por si só (aqui alcançada com o tratamento crônico com o hormônio) impedir a neuritogênese induzida pelo NGF já é um grande resultado que contribui para a visão da DA como sendo uma DM tipo II encefálica.

Existem artigos mostrando que a exposição crônica à insulina é capaz de induzir a resistência de crescimento de neuritos por fatores de crescimento em neurônios sensoriais (SING et al., 2012). Podemos dizer que o mesmo efeito é encontrado em neurônios do sistema nervoso central.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho consegue alcançar conclusões importantes e pioneiras a respeito dos efeitos da STZ sob a linhagem celular Neuro-2A.

Foi possível identificar o intervalo de dose não tóxico às células em períodos agudos, bem como as condições ideais para o tratamento de 48 horas com a droga, bem como uma breve descrição do padrão de doação espontânea de NO pela STZ.

O acompanhamento da ativação da via PI3K / Akt em períodos agudos após a administração da droga foi um resultado particularmente interessante. Nesses experimentos foi possível a identificação do papel fundamental do NO doado pela droga, que provoca a nitrosilação e inativação da proteína Akt, o que resulta numa maior atividade da GSK3- β nesses períodos curtos.

A descrição do perfil de geração de espécies reativas de oxigênio após administração da STZ também foi um experimento que obteve um resultado bastante interessante, embora mais experimentos seriam necessários para identificação da origem e contribuição dessas espécies reativas na indução dos fenômenos observados.

Por fim, foi possível comprovar que a estreptozotocina é capaz de induzir um estado de resistência insulínica na linhagem neuronal utilizada e que esse fenômeno é dependente de NO. Além disso, a partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível inferir que a droga é capaz de prejudicar a neuritogênese induzida por NGF. Tal efeito pode ser atribuído à ação diabetogênica da droga, uma vez que neurônios resistentes à insulina também falharam na mesma tarefa.

REFERÊNCIAS*

- ALEJANDRA, D. A.; JOHN, D. C.; BIN, L.; CHRISTOPHER, P. C.; MARIA, E. A.; INGE, G. I.; KHALID, I. Phosphorylation of Tau at THR212, THR231 and SER262 combined and not individually causes neurodegeneration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 30851-30860, 2010.
- ARULMOZHI, D. K.; VEERANJANEYULU, A.; BODHANKAR, S. L. Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus : A glance. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 4, p. 217-221, 2004.
- BELL, R. D.; ZLOKOVIC, B. V. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. **Acta. Neuropathol.**, v. 118, n. 1, p. 103-113, 2009.
- BERRIDGE, M. J. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. **Pflugers Arch.**, v. 459, n. 3, p. 441-449, 2010.
- BIESSELS, G. J.; KAPPELLE, L. J. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, n. 4, p. 1041-1033, 2005.
- BLOKLAND, A; JOLLES, J. Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, n. 2, p. 491-494, 1993.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n. 3, p. 248-254, 1976.
- BROWN, G. C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1411, n. 4, p. 351-369, 1999.
- BUXBAUM, J. D.; GANDY, S. E.; CICCHETTI, P.; EHRLICH, M. E.; CZERNIK, A. J.; FRACASSO, R. P.; RAMABHADRAN, T. V.; UNTERBECK, A. J.; GREENGARD, P. Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87, n. 15, p. 6003-6006, 1990.
- CHUNG, S. H. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's Disease. **BMB Rep.**, v. 42, n. 8, p. 467-474, 2009.
- CONNER, J. M.; FRANKS, K. M.; TITTERNESS, A. K.; RUSSELL, K.; MERRILL, D. A.; CHRISTIE, B. R.; SEJNOWSKI, T. J.; TUSZYNSKI, M. H. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 35, p. 10883-10889, 2009.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CORREIA, S. C.; SANTOS, R. X.; PERRY, G.; ZHU, X.; MOREIRA, P. L.; SMITH, M. A. Insulin-resistant brain state: The culprit in sporadic Alzheimer's disease? **Aging Research Reviews**, v. 10, n. 2, p. 264-273, 2011.

CROSS, D. A. E.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMING, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated protein kinase. **Nature**, v. 378, n. 28, p. 785-789, 2005.

DE LA MONTE, S. M. Insulin resistance and Alzheimer's disease. **BMB Rep.**, v. 42, n. 8, p. 475-481, 2009.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. **J. Alzheimers. Dis.**, v. 7, n. 1, p. 45-61, 2005.

DECKER, T.; LOHMANN-MATTES, M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **J. Immunol. Meth.**, v. 115, n. 1, p. 61-69, 1988.

DEVRED, F.; BARBIER, P.; LAFITTE, D.; LANDRIEU, I.; LIPPENS, G.; PEYROT, V. Microtubule and MAPs: thermodynamics of complex formation by AUC, ITC, fluorescence, and NMR. **Methods Cell Biol.**, v. 95, p. 449-480, 2010.

DING, X. L.; HUSSEMAN, J.; TOMASHEVSKI, A.; NOCHLIN, D.; JIN, L. W.; VINCENT, I. The cell cycle Cdc25A tyrosine phosphatase is activated in degenerating postmitotic neurons in Alzheimer's disease. **Am. J. Pathol.**, v. 157, p. 1983-1990, 2000.

DOWJAT, W. K.; ADAYEV, T.; KUCHNA, I.; NOWICKI, K.; PALMINIELLO, S.; HWANG, Y. W.; WEGIEL, J. Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. **Neurosci. Lett.**, v. 413, p. 77-81, 2007.

DUELLI, R.; SCHROCK, H.; KUSCHINSKY, W.; HOYER, S. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 12, n. 8, p. 737-743, 1994.

DURÁN-REYES, G.; PASCOE-LIRA, D.; VILAR-ROJAS, C.; MEDINA-NAVARRO, R.; DÍAZ-FLORES, M.; ORTEGA-CAMARILLO, C.; GARCÍA-MACEDO, R.; CRUZ, M.; RODRÍGUEZ, J. K. Diabetogenic effect of STZ diminishes with the loss of nitric oxide: role of ultraviolet light and carboxy-PTIO. **Pharmacology**, v. 71, n. 1, p. 17-24, 2004.

EDWARD, Z.; SUSAN, S.; MARTIN, T. Imaging is superior to cognitive testing for early diagnosis of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 25, p. 685-691, 2004.

FABER-LANGENDOEN, K.; MORRIS, J. C.; KNESEVICH, J. W.; LABARGE, E.; MILLER, J. P.; BERG, L. Aphasia in senile dementia of the Alzheimer type. **Ann. Neurol.**, v. 23, p. 365-370, 1988.

FEINSTEIN, D. L.; GALEA, E.; CERMAK, J.; CHUGH, P.; LYANDVERT, L.; REIS, D. J. Nitric oxide synthase expression in glial cells: suppression by tyrosine kinase inhibitors. **J. Neurochem.**, v. 62, p. 811-814, 1994.

FRANK, J. M.; MALCOLM, M. S. H.; DEAN, F. Systematic Review of Measures of Clinical Significance Employed in Randomized Controlled Trials of Drugs for Dementia. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 57, n. 3, p. 536-546, 2009.

FROLICH, L.; BLUM-DEGEN, D.; BERNSTEIN, H. G.; ENGELSBERGER, S.; HUMRICH, J.; LAUFER, S.; MUSCHNER, D.; THALHEIMER, A.; TURK, A.; HOYER, S.; ZOCHLING, R.; BOISSEL, K. W.; JELLINGER, K.; RIEDERER, P. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. **J. Neural. Transm.**, v. 105, p. 423-438, 1998.

GASPARINI, L.; GOURAS, G. K.; WANG, R.; GROSS, R. S.; BEAL, M. F.; GREENGARD, P.; XU, H. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 8, p. 2561-2570, 2001.

GASPARINI, L.; NETZER, W. J.; GREENGARD, P.; XU, H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, n. 6, p. 288-293, 2002.

GONG, C. X.; SINGH, T. J.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. **J. Neurochem.**, v. 61, p. 921-927, 1994

GRIFFIN, R. J.; MOLONEY, A.; KELLIHER, M.; JOHNSTON, J. A.; RAVID, R.; DOCKERY, P.; O'CONNOR, R.; O'NEILL, C. 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. **J. Neurochem.**, v. 93, p. 105-117, 2005.

GRUNBLATT, E.; KOUTSILIERI, E.; HOYER, S.; RIEDERER, P. Gene expression alterations in brain areas of intracerebroventricular streptozotocin treated rat. **J. Alzheimers. Dis.**, v. 9, n. 3, p. 261-71, 2006.

GRUNBLATT, E.; SALKOVIC-PETRISIC, M.; OSMANOVIC, J.; RIEDERER, P.; HOYER, S. Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. **J. Neurochem.**, v. 101, n. 3, p. 757-770, 2007.

GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, p. 126-152, 2005.

GUPTA, A.; BISHT, B.; DEY, C. S. Focal adhesion kinase negatively regulates neuronal insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 1030-1037, 2012.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J. Immunol. Meth.**, v. 119, p. 203-210, 1989.

HASHIKAWA-HOBARA, N.; HASHIKAWA, N.; YUTANI, C.; ZAMAMI, Y.; JIN, X.; TAKATORI, S.; MIO, M.; KAWASAKI, H. The Akt-nitric oxide-cGMP pathway contributes to nerve growth factor-mediated neurite outgrowth in apolipoprotein E knockout mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 338, n. 2, p. 694-700, 2011.

HEBERT, L. E.; SCHERR, P. A.; BIENIAS, J. L.; BENNETT, D. A.; EVANS, D. A. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. **Arch. Neurol.**, v. 60, p. 1119-1122, 2003.

HELLWEG, R.; NITSCH, R.; HOCK, C.; JAKSCH, M.; HOYER, S. Nerve growth factor and choline acetyltransferase activity levels in the rat brain following experimental impairment of cerebral glucose and energy metabolism. **J. Neurosci. Res.**, v. 31, p. 479-486, 1992.

HENNEBERG, N.; HOYER, S. Desensitization of the neuronal insulin receptor: a new approach in the etiopathogenesis of late-onset sporadic dementia of the Alzheimer type (SDAT)? **Arch. Gerontol. Geriatr.**, n. 21, p. 63-74, 1995.

HONG, M.; CHEN, D. C.; KLEIN, P. S.; LEE, V. M. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 40, p. 25326-25332, 1997.

HOOPER, C.; KILLICK, R.; LOVESTONE, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. **J. Neurochem.**, v. 104, n. 6, p. 1433-1439, 2008.

HOYER, S.; LANNERT, H.; LATTEIER, E.; MEISEL, T. Relationship between cerebral energy metabolism in parietotemporal cortex and hippocampus and mental activity during aging in rats. **J. Neural. Transm.**, n. 111, p. 575-589, 2004.

HOYER, S.; LANNERT, H. Long-term effects of corticosterone on behavior, oxidative and energy metabolism of parietotemporal cerebral cortex and hippocampus of rats: comparison to intracerebroventricular streptozotocin. **J. Neural. Transm.**, v. 115, n. 9, p. 1241-1249, 2008.

HOYER, S. Abnormalities of glucose metabolism in Alzheimer's disease. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 640, p. 53-58, 1991.

HOYER, S. Memory function and brain glucose metabolism. **Pharmacopsychiatry**, v. 35, n. 1, p. 62-67, 2003.

HOYER, S. Risk factors for Alzheimer's disease during aging. Impacts of glucose/energy metabolism. **J. Neural. Transm. Suppl.**, v. 54, p. 187-194, 1998.

HOYER, S. The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. **J. Neural Transm.**, v.109, p. 341-360, 2002.

HOYER, S.; LANNERT, H.; LATTEIER, E.; MEISEL, T. Relationship between cerebral energy metabolism in parietotemporal cortex and hippocampus and mental activity during aging in rats. **J. Neural. Transm.**, v. 111, p. 575-589, 2004

HYE, A.; KERR, F.; ARCHER, N.; FOY, C.; POPPE, M.; BROWN, R.; HAMILTON, G.; POWELL, J.; ANDERTON, B.; LOVESTONE, S. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.**, v.373, p. 1-4, 2005

IKONOMOVIC, M.; MUFSON, E.; WUU, J.; COCHRAN, E.; BENNETT, D.; DEKOSKY, S. Cholinergic plasticity in hippocampus of individuals with mild cognitive impairment: correlation with Alzheimer's neuropathology. **J. Alzheimers. Dis.**, v. 5, p. 39-48, 2003.

IQBAL, K.; ALONSO, A. C.; GONG, C. X.; KHATOON, S.; PEI, J. J.; WANG, J. Z.; GRUNDKE-IQBAL, I. Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. **J. Neural. Transm. Suppl.**, v. 53, p. 169-180, 1998.

IQBAL, K.; LIU, F.; GONG, C. X.; GRUNDKE-IQBAL, I. Tau in Alzheimer Disease and related Tauopathies. **Curr. Alzheimer. Res.**, v. 7, n. 8, p. 656-664, 2010.

ISHRAT, T.; PARVEEN, K.; HODA, M. N.; KHAN, M. B.; YOUSUF, S.; ANSARI, M. A.; SALEEM, S.; ISLAM, F. Effects of Pycnogenol and vitamin E on cognitive deficits and oxidative damage induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **Behav. Pharmacol.**, v. 20, n. 7, p. 567-575, 2009.

JOHNSON, G. V.; BAILEY, C. D. The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. **Exp. Neurol.**, v. 183, p. 263-268, 2003

JOHNSTON, A. M.; PIROLA, L.; VAN OBBERGHEN, E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. **FEBS Lett.**, v. 546, p. 32-36, 2003.

KANG, J.; LEMAIRE, H. G.; UNTERBECK, A.; SALBAUM, J. M.; MASTERS, C. L.; GRZESCHIK, K. H.; MULTHAUP, G.; BEYREUTHER, K.; MULLER-HILL, B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. **Nature**, v. 325, p. 733-736, 1987

KAR, S.; SLOWIKOWSKI, S. P.; WESTAWAY, D.; MOUNT, H. T. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. **J. Psychiatry Neurosci.**, v. 29, n. 6, p. 427-441, 2004.

KIM, S. H.; NAIRN, A. C.; CAIRNS, N.; LUBEC, G. Decreased levels of ARPP-19 and PKA in brains of Down syndrome and Alzheimer's disease. **J. Neural Transm. Suppl.**, v. 61, p. 263-272, 2001.

KIMURA, R.; KAMINO, K.; YAMAMOTO, M.; NURIPA, A.; KIDA, T.; KAZUI, H.; HASHIMOTO, R.; TANAKA, T.; KUDO, T.; YAMAGATA, H.; TABARA, Y.; MIKI, T.; AKATSU, H.; KOSAKA, K.; FUNAKOSHI, E.; NISHITOMI, K.; SAKAGUCHI, G.; KATO, A.; HATTORI, H.; UEMA, T.; TAKEDA, M. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges

between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. **Hum. Mol. Genet.**, v. 16, p. 15-23, 2007.

KOLIBAS, E.; KORINKOVA, V.; NOVOTNY, V.; VAJDICKOVA, K.; HUNAKOVA, D. ADAS-cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale — cognitive subscale) — validation of the Slovak version. **Bratisl Lek Listy**, v. 101, n. 11, p. 598–602, 2000.

KUMAR, A.; SEGHAL, N.; NAIDU, P. S.; PADI, S. S.; GOYAL, R. Colchicines-induced neurotoxicity as an animal model of sporadic dementia of Alzheimer's type. **Pharmacol. Rep.**, v. 59, n 3, p. 274-283, 2007.

LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. **J. Mol. Biol.**, v. 47, p. 69-85, 1970.

LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behav. Neurosci.**, v. 112, n. 5, p. 1199-1208, 1998.

LAW, A.; GAUTHIER, S.; QUIRION, R. Neuroprotective and neurorescuing effects of isoform-specific nitric oxide synthase inhibitors, nitric oxide scavenger, and antioxidant against beta amyloid toxicity. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, p. 1114-1124, 2001.

LELOUP, C. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. **Brain Research**, v. 638, p. 221-226, 1994.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LEROY, K.; YILMAZ, Z.; BRION, J. P. Increased level of active GSK-3b in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 33, p. 43-55, 2007.

LIANG, Z.; LIU, F.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; GONG, C. X. Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. **J. Neurochem.**, v. 103, p. 2462-2470, 2007.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J. Neurochem.**, v. 69, n. 2, p. 581-593, 1997.

LIU, F.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I.; ROSSIE, S.; GONG, C. X. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 1790-1796, 2005a.

LIU, F.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; GONG, C. X. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. **Eur. J. Neurosci.**, v. 22, p. 1942-1950, 2005b.

LIU, F.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; ODA, Y.; TOMIZAWA, K.; GONG, C. X. Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 37755-37762, 2005c.

LOPES, J.; SÍLVIA, M. O.; FORTUNATO, J. S. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas: relação com as complicações da diabetes mellitus tipo 2. **Acta. Med. Port.**, v. 21, p. 293-302, 2008.

LÓPEZ-CARBALLO, G.; MORENO, L.; MASIÁ, S.; PÉREZ, P.; BARETTINO, D. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 28, p. 25297-25304, 2002.

MANDELKOW, E. M.; DREWES, G.; BIERNAT, J.; GUSTKE, N.; VAN LINT, J.; VANDENHEEDE, J. R.; MANDELKOW, E. Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. **FEBS Lett.**, v. 314, n. 3, p. 315-321, 1992.

MARKOWSKA, A. L.; KOLIATSOS, V. E.; BRECKLER, S. J.; PRICE, D. L.; OLTON, D. S. Human nerve growth factor improves spatial memory in aged but not in young rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 8, p. 4815-4824, 1994.

MORRIS, J. C.; DRAZNER, M.; FULLING, K.; GRANT, E. A.; GOLDRING, J. Clinical and pathological aspects of parkinsonism in Alzheimer's disease. A role for extranigral factors? **Arch. Neurol.**, v. 46, p. 651-657, 1989.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAVA, B.; JULIA, K.; ILANA, K.; HILLA, O.; ASSAF, R. Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 27-71, 2009.

NUMAJIRI, N.; TAKASAWA, K.; NISHIYA, T.; TANAKA, H.; OHNO, K.; HAYAKAWA, W.; ASADA, M.; MATSUDA, H.; AZUMI, K.; KAMATA, H.; NAKAMURA, T.; HARA, H.; MINAMI, M.; LIPTON, S. A.; UEHARA, T. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, n. 25, p. 10349-10354, 2011.

O'BRIEN, J. T. Role of imaging techniques in the diagnosis of dementia. **The British Journal of Radiology**, v. 80, p. 71-77, 2007.

OTTH, C.; MENDOZA-NARANJO, A.; MUJICA, L.; ZAMBRANO, A.; CONCHA, II; MACCIONI, R. B. Modulation of the JNK and p38 pathways by cdk5 protein kinase in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroreport**, v. 14, p. 2403-2409, 2003.

PAPACONSTANTINO, J. Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 299, p. 89-100, 2009.

PATRICK, G. N.; ZUKERBERG, L.; NIKOLIC, M.; DE LA MONTE, S.; DIKKES, P.; TSAI, L. H. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. **Nature**, v. 402, p. 615-622, 1999.

PATTEN, D. A.; GERMAIN, M.; KELLY, M. A.; SLACK, R. S. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. **J. Alzheimers. Dis.**, v. 20, p. 357-367, 2010.

PEI, J. J.; BRAAK, H.; AN, W. L.; WINBLAD, B.; COWBURN, R. F.; IQBAL, K.; GRUNDKE- IQBAL, I. Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 109, p. 45-55, 2002.

PEI, J. J.; KHATOON, S.; AN, W. L.; NORDLINDER, M.; TANAKA, T.; BRAAK, H.; TSUJIO, I.; TAKEDA, M.; ALAFUZZOFF, I.; WINBLAD, B.; COWBURN, R. F.; GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. **Acta. Neuropathol.**, v. 105, p. 381-392, 2003.

PEI, J. J.; TANAKA, T.; TUNG, Y. C.; BRAAK, E.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 56, p. 70-78, 1997.

PINTON, S.; DA ROCHA, J. T.; GAI, B. M.; NOGUEIRA, C. W. Sporadic dementia of Alzheimer's type induced by streptozotocin promotes anxiogenic behavior in mice. **Behav. Brain Res.**, v. 223, n. 1, p. 1-6, 2011.

PLASCHKE, K.; HOYER, S. Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic and glycogenolytic metabolism in adult rat brain cortex and hippocampus. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 11, p. 477-483, 1993.

PRICKAERTS, J.; DE VENTE, J.; HONIG, W.; STEINBUSCH, H.; ITTERSUM, M. M. V.; BLOKLAND, A.; STEINBUSCH, H. W. Nitric oxide synthase does not mediate neurotoxicity after an i.c.v. injection of streptozotocin in the rat. **J. Neural. Transm.**, v. 107, p. 745-766, 2000.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 362, n. 4, p. 329-344, 2010.

RATAN, V. B.; SAMANTHA, L. B. H.; JESUS, A. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, p. 1313-1317, 2004

RICKLE, A.; BOGDANOVIC, N.; VOLKMAN, I.; WINBLAD, B.; RAVID, R.; COWBURN, R. F. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Neuroreport**, v. 15, p. 955-959, 2004

RICKLE, A.; BOGDANOVIC, N.; VOLKMANN, I.; ZHOU, X.; PEI, J. J.; WINBLAD, B.; COWBURN, R. F. PTEN levels in Alzheimer's disease medial temporal cortex. **Neurochem. Int.**, v. 48, p. 114-123, 2006.

RIVERA, E. J.; GOLDIN, A.; FULMER, N.; TAVARES, R.; WANDS, J. R.; DE LA MONTE, S. M. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. **J. Alzheimers. Dis.**, v. 8, n. 3, p. 247-268, 2005.

RUBIN, E. H.; MORRIS, J. C.; STORANDT, M.; BERG, L. Behavioral changes in patients with mild senile dementia of the Alzheimer's type. **Psychiatry Res.**, v. 21, p. 55- 62, 1987.

RYOO, S. R.; CHO, H. J.; LEE, H. W.; JEONG, H. K.; RADNAABAZAR, C.; KIM, Y. S.; KIM, M. J.; SON, M. Y.; SEO, H.; CHUNG, S. H.; SONG, W. J. Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. **J. Neurochem.**, v. 104, p. 1333-1344, 2008.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. **J. Neural Transm. Suppl.**, v. 72, p. 217-233, 2007.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; OSMANOVIC-BARILAR, J.; BRÜCKNER, M. K.; HOYER, S.; ARENDT, T.; RIEDERER, P. Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. **J. Neural Transm.**, v. 118, n. 5, p. 765-772, 2011.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; TRIBL, F.; SCHMIDT, M.; HOYER, S.; RIEDERER, P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **J. Neurochem.**, v. 96, p. 1005-1015, 2006.

SANTOS, T. O.; MAZUCANTI, C. H. Y.; XAVIER, G. F.; TORRÃO, A. S. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. **Physiology and behavior**, v. 107, n. 3, p. 401-413, 2012.

SHEN, J. Y.; YI, X. X.; XIONG, N. X.; WANG, H. J.; DUAN, X. W.; ZHAO, H. Y. GSK-3 β activation mediates Nogo-66-induced inhibition of neurite outgrowth in N2a cells. **Neurosci. Lett.**, v. 505, n. 2, p. 165-170, 2011.

SHOHAM, S.; BEJAR, C.; KOVALEV, E.; SCHORER-APELBAUM, D.; WEINSTOCK, M. Ladostigil prevents gliosis, oxidative-nitrative stress and memory deficits induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 836-843, 2006.

SINGH, B.; XU, Y.; MCLAUGHLIN, T.; SINGH, V.; MARTINEZ, J. A.; KRISHNAN, A.; ZOCHODNE, D. W. Resistance to trophic neurite outgrowth of sensory neurons exposed to insulin. **J. Neurochem.**, v. 121, n. 2, p. 263-276, 2012.

SOLANO, D. C.; SIRONI, M.; BONFINI, C.; SOLARTE, S. B.; GOVONI, S.; RACCHI, M. Insulin regulates soluble amyloid precursor protein release via phosphatidyl inositol 3 kinase-dependent pathway. **FASEB J.**, v. 14, p. 1015-1022, 2000.

SPIRES, T. L.; HYMAN, B. T. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. **NeuroRx**, v. 2, p. 423-437, 2005.

SWATTON, J. E.; SELLERS, L. A.; FAULL, R. L.; HOLLAND, A.; IRITANI, S.; BAHN, S. Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. **Eur. J. Neurosci.**, v. 19, p. 2711-2719, 2004.

SWEARER, J. M.; DRACHMAN, D. A.; O'DONNELL, B. F.; MITCHELL, A. L. Troublesome and disruptive behaviors in dementia. Relationships to diagnosis and disease severity. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 36, p. 784–790, 1988.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. **J. Alzheimers Dis.**, v. 20, n. 2, p. 265-279, 2010.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.** v. 50, p. 537-546, 2001.

TAKADA, J. Neonatal streptozotocin-induces diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 56, n. 7, p. 977-984, 2007.

TANDON, A.; YU, H.; WANG, L.; ROGAEVA, E.; SATO, C.; CHISHTI, M. A.; KAWARAI, T.; HASEGAWA, H.; CHEN, F.; DAVIES, P.; FRASER, P. E.; WESTAWAY, D.; ST GEORGE- HYSLOP, P. H. Brain levels of CDK5 activator p25 are not increased in Alzheimer's or other neurodegenerative diseases with neurofibrillary tangles. **J. Neurochem.**, v. 86, p. 572-581, 2003.

VAN DER HEIDE, L. P.; RAMAKERS, G. M. J.; SMIDT, M. P. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. **Prog. Neurobiol.**, v. 79, p. 205-221, 2006.

VAN DYKE, K.; GHAREEB, E.; VAN DYKE, M.; SOSA, A.; HOELDTKE, R. D.; VAN THIEL, D. H. Luminescence experiments involved in the mechanism of streptozotocin diabetes and cataract formation. **Luminescence**, v. 23, n. 6, p. 386-391, 2008.

VAN DYKE, K.; JABBOUR, N.; HOELDTKE, R.; VAN DYKE, C.; VAN DYKE, M. Oxidative/nitrosative stresses trigger type I diabetes: preventable in streptozotocin rats and detectable in human disease. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1203, p. 138-145, 2010.

VEERENDRA KUMAR, M. H.; GUPTA, Y. K. Effect of Centella asiatica on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 30, n. 5-6, p. 336-342, 2003.

VINCENT, I.; BU, B.; HUDSON, K.; HUSSEMAN, J.; NOCHLIN, D.; JIN, L. Constitutive Cdc25B tyrosine phosphatase activity in adult brain neurons with M phase-type alterations in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 105, p. 639-650, 2001.

VOGELSBERG-RAGAGLIA, V.; SCHUCK, T.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. **Exp. Neurol.**, v. 168, p. 402-412, 2001.

WADA, R.; YAGIHASHI, S. Nitric oxide generation and poly(ADP ribose) polymerase activation precede beta-cell death in rats with a single high-dose injection of streptozotocin. **Virchows Arch.**, v. 444, n. 4, p. 375-382, 2004.

WALZ, R.; ROESLER, R.; REINKE, A.; MARTINS, M. R.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. Short- and long-term memory are differentially modulated by hippocampal nerve growth factor and fibroblast growth factor. **Neurochem. Res.**, v. 30, n. 2, p. 185-190, 2005.

WANG, L.; SHIM, H.; XIE, C.; CAI, H. Activation of protein kinase C modulates BACE1-mediated beta-secretase activity. **Neurobiol. Aging**, v. 29, p. 357-367, 2008.

YASOJIMA, K.; KURET, J.; DEMAGGIO, A. J.; MCGEER, E.; MCGEER, P. L. Casein kinase 1 δ mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. **Brain Res.**, v. 865, p. 116-120, 2000.

YASUKAWA, T.; TOKUNAGA, E.; OTA, H.; SUGITA, H.; MARTYN, J. A.; KANEKI, M. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 9, p. 7511-7518, 2005.

YOSHIMURA, S.; BANNO, Y.; NAKASHIMA, S.; HAYASHI, K.; YAMAKAWA, H.; SAWADA, M. SAKAI, N.; NOZAWA, Y. Inhibition of neutral sphingomyelinase activation and ceramide formation by glutathione in hypoxic PC12 cell death. **J. Neurochem.**, v. 73, p. 675-683, 1999.

ZHOU, F. Q.; ZHOU, J.; DEDHAR, S.; WU, Y. H.; SNIDER, W. D. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 β and functions of the microtubule plus end binding protein APC. **Neuron**, v. 42, n. 6, p. 897-912, 2004.

ZHU, X.; LEE, H. G.; RAINA, A. K.; PERRY, G.; SMITH, M. A. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. **Neurosignals**, v. 11, p. 270-281, 2002.

ZHU, X.; RAINA, A. K.; LEE, H. G.; CHAO, M.; NUNOMURA, A.; TABATON, M.; PETERSEN, R. B.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and neuronal adaptation in Alzheimer disease: the role of SAPK pathways. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 5, p. 571-576, 2003.