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

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 by 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.

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).

somente é Atualmente diagnóstico 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 diagnostico 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 (βA) 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 βA através da barreira hematoencefálica 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 Ca²⁺. Os oligômeros de beta-amiloide aumentam a entrada de Ca²⁺ nas células e mais Ca2+ 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 Ca2+ dos reservatórios intracelulares. Existem evidências indicando que várias mutações relacionadas com a DA podem induzir alterações na sinalização de Ca²⁺. No entanto, a questão do que ocorre primeiro, a ativação da via amiloidogênica ou as alterações na sinalização de Ca²⁺, 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 Parkisonismo 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 (GSK3β), 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		
G SK3β	Aumentada	Hye et al. (2009), Leroy, Yilmaz e Brion (2007), Pei at 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 ½	Aumentada	Swatton et al. (2004), Zhu et al. (2002), Pei a t 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 at 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 βA, 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).

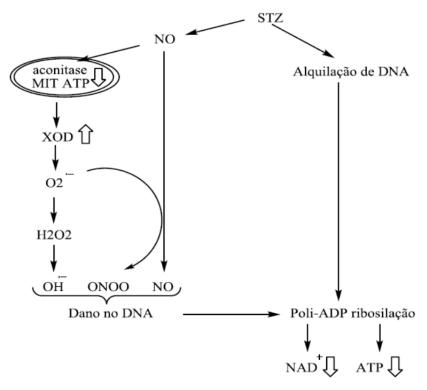
Considerando a presença de insulina e IR no encéfalo, um modelo experimental em ratos foi desenvolvido usando estreptozotocina (STZ) para induzir disfunção do sistema de insulina encefálico. A STZ (uma glicosaina derivada de nitrosuréia) é uma droga seletivamente tóxica às células B pancreáticas, induzindo 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 papeis 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.

Perifericamente, 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 βA 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 βA (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-kB, 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, consequentemente, facilita respostas intracelulares dependentes de fosforilação em tirosina, como é o caso da sinalização de insulina (PAPACONSTANTINOU, 2009).

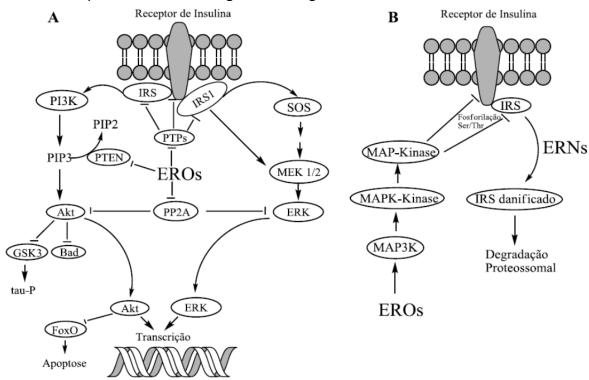


Figura 2 - Possíveis interferências na cascata de sinalização de insulina provocadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

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.

5 CONLUSÕES

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. Phosphorilation 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. Insulinresistant 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.; HEMMINGS, 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.; BOISSL, K. W.; JELLINGER, K.; RIEDERER, P. Brain insulin and insulin receptors in aging andsporadic 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 streptozotocinintracerebroventricularly 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. Sie.**, 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 betaamyloid 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 insulinoresistência e disfunção das células ß-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.

PAPACONSTANTINOU, 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.; ALAFUZOFF, 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-3β 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 differentialy 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 d 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. Snitrosylation-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-3beta 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.