

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

TAISA DE OLIVEIRA SANTOS

INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE
ESTREPTOZOTOCINA GERA EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS
SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE PROTEÍNAS INDICADORAS DE
NEURODEGENERAÇÃO EM RATOS

SÃO PAULO

2010

TAISA DE OLIVEIRA SANTOS

Injeção intracerebroventricular de estreptozotocina gera efeitos agudos e crônicos sobre a memória e sobre proteínas indicadoras de neurodegeneração em ratos

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como exigência parcial para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Andréa da Silva Torrão

SÃO PAULO

2010

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

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Santos, Taisa de Oliveira.

Injeção intracerebroventricular de estreptozotocina gera efeitos agudos e crônicos sobre a memória e sobre proteínas indicadoras de neurodegeneração em ratos / Taisa de Oliveira Santos; orientadora Andréa da Silva Torrão. -- São Paulo, 2010.

77 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Demência 2. Doença de Alzheimer 3. Distúrbios cognitivos 4. Distúrbios da memória 5. Memória 6. Distúrbios do metabolismo I. Título.

RC521

FOLHA DE APROVAÇÃO

Taisa de Oliveira Santos

Injeção intracerebroventricular de estreptozotocina gera efeitos agudos e crônicos sobre a memória e sobre proteínas indicadoras de neurodegeneração em ratos

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aprovação Comitê de Ética

Dedicatória

Aos que amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente pela força em todas as circunstâncias, principalmente nas que pareciam impossíveis, e por abençoar a minha escolha e todo o meu caminho.

Tenho muitas pessoas para agradecer, mas existem algumas que são mais do que especiais, principalmente para a conclusão desta etapa.

À minha família, por ser exemplo para mim e por todas as privações à que se submeteu para me ajudar, por apoiar a minha decisão. Ao meu Pai Raimundo, por demonstrar com todo o seu amor que, quando queremos, tudo conseguimos, bastam força e coragem; por ser o melhor pai do mundo, sempre educando com carinho e compreensão; por ser o principal motivo da minha vida. À minha mãe Lourdes, por cuidar de mim e dedicar sua vida a isso e por me ensinar que na vida a educação e o respeito pelo ser humano são essenciais. Sem o apoio deles eu nunca teria conseguido nada. À minha irmã Vitória, por ser luz na minha vida. Ela alivia as coisas difíceis e me mostra como tudo pode ser mais simples se assim quisermos enxergar. Aos três, por serem a família perfeita.

À minha orientadora Andréa Torrão, que tornou possível este trabalho, pela ajuda na minha decisão e por se dispor a me ensinar toda a parte prática e teórica. Tenho que agradecer por você ter acreditado em mim e neste trabalho, por ter apostado suas fichas e, acima de tudo, por ter entrado nele comigo. Mas também tenho que agradecer a Dedé, que fora do laboratório é umas das minhas melhores amigas, sabendo dividir muito bem as duas coisas. Obrigada por todo o apoio em tantos momentos, pela paciência, por me escutar e por todos os sorrisos.

Ao “Chefe”, pela oportunidade que me concedeu, e pela confiança que depositou em mim, me ajudando, apoiando e aceitando em seu laboratório, na época da iniciação científica, e por continuar me apoiando agora.

Ao Caio e a Mona, sem eles este trabalho não seria o mesmo, obrigada por toda ajuda ou até mesmo por todas as discussões. Vocês são parte disto tudo.

Tenho muitos amigos a agradecer...

Tatati, pela sua amizade, irmãzinha, e por tudo o que você me ensinou... sempre que existia algo relacionado à estatística ou algum problema no computador sempre corria pra te chamar. Obrigada por toda vez me salvar.

Ao Adilson, técnico do laboratório, sempre salvando a gente no laboratório e sempre disposto a ajudar O que seria da vida sem ele? Na vida, um grande amigo e uma pessoa com um grande coração que faz com que tudo seja mais alegre.

Erika e Ana, muito difícil conseguir agradecer vocês por tudo, são tantas coisas. Obrigada pela moradia, pelos almoços, pelas conversas, pela paciência e acima de tudo pela amizade sincera.

Moço, obrigada por ser meu anjo e por todo apoio, sem você por perto o caminho teria sido muito difícil.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia Celular, por toda a ajuda, tanto na parte científica, como trazendo mais alegria aos meus dias. Por me receberem e me apoiarem em todos os momentos, sendo exemplos para mim.

Um agradecimento mais do que especial a todos os meus amigos, que ajudaram a fazer este trabalho e que me ajudaram a esquecer-lo às vezes, quando necessário. Aos colegas da CN que tornaram o caminho mais alegre, e que compartilharam comigo bons e desagradáveis momentos.

Aos meus grandes amigos Aline, Eli, Joice, Laine, Leila, Maira, Eric e Edson, pela paciência e por toda a ajuda.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram na minha escolha, e a todas as pessoas que contribuíram com este trabalho, direta e/ou indiretamente.

Ao apoio financeiro da FAPESP.

RESUMO

SANTOS, T.O. Injeção intracerebroventricular de estreptozotocina gera efeitos agudos e crônicos sobre a memória e sobre proteínas indicadoras de neurodegeneração em ratos. São Paulo, 2010. 77p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

A Doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência e é caracterizada clinicamente por comprometimentos cognitivos. Histologicamente é caracterizada pela formação de placas senis e de emaranhados neurofibrilares intracelulares resultantes de alterações do metabolismo do peptídeo β A e da hiperfosforilação da proteína tau, respectivamente. Essas alterações parecem, em parte, ser uma decorrência de uma deficiência na sinalização da insulina e conseqüente resistência do encéfalo a esse hormônio, sugerindo que a DA esporádica tenha uma relação com o Diabetes mellitus. A estreptozotocina tem sido utilizada como modelo de indução do Diabetes, e mais recentemente como modelo experimental da DA quando administrado intracerebroventricular. Nosso objetivo nesse estudo foi o de caracterizar o esse modelo experimental da DA induzido pela estreptozotocina, avaliando as conseqüências agudas e a longo prazo. Foram utilizados ratos Wistar machos de quatro meses de idade que receberam injeções intracerebroventriculares bilaterais de estreptozotocina ou de veículo. Os animais foram avaliados aguda e cronicamente por testes comportamentais de memória de referência e operacional utilizando o modelo do labirinto aquático de Morris que visavam avaliar o curso temporal dos prejuízos cognitivos após a injeção da droga. Em diferentes tempos após as injeções, os ratos foram sacrificados e regiões do encéfalo submetidas à técnica de immunoblotting para avaliação de proteínas indicadoras de neurodegeneração ou à técnica histoquímica pelo método de Fluoro-Jade C. A avaliação da memória operacional em períodos agudos mostrou que os prejuízos cognitivos parecem se instalar a partir de 3 horas da injeção de estreptozotocina. A avaliação crônica das memórias operacional e de referência mostrou que os ratos exibiram um prejuízo marcante no desempenho dessas tarefas ao longo dos testes, embora seja correto afirmar que esses animais ainda são capazes de adquirir informação relevante com relação à execução da tarefa, particularmente na versão de memória de referência. A análise de immunoblotting mostrou haver aumento da expressão do peptídeo beta amilóide significativo em regiões como amígdala, córtex entorrinal, núcleos da base e do hipotálamo. Também foi observado um aumento significativo da fosforilação da proteína tau na amígdala, cerebelo, córtex, prosencéfalo basal e núcleos da base. Foi observada uma diminuição da enzima de síntese de acetilcolina, a colina acetil-transferase apenas na amígdala. Fibras em degeneração foram observadas no hipotálamo, na área septal e em neurônios piramidais na região CA1 após 1 dia da injeção de estreptozotocina. Já após 15 dias da injeção podemos observar marcação em neurônios do estriado e da região CA1 do hipocampo e em fibras próximas ao giro denteado. Em resumo a injeção intracerebroventricular de estreptozotocina parece produzir um bom modelo experimental da DA, pois reproduz as características cognitivas e histológicas encontradas nos pacientes com a doença.

Palavras chave: Demência, Doença de Alzheimer, desordem cognitiva, memória, distúrbios de memória, distúrbios do metabolismo.

ABSTRACT

SANTOS, T.O. Intracerebroventricular streptozotocin injection in rats generates acute and chronic effects upon memory and neurodegenerative markers. São Paulo, 2010. 77p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo.

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in aged humans. Recent reports have suggested a relationship between the onset of AD and an insulin-resistant brain condition. In this context, this study aimed at evaluating the effects of intracerebroventricular (ICV) injection of streptozotocin (STZ) in rats on behavior and neurodegeneration. Four month-old adult male *Wistar* rats were subjected to bilateral ICV injections of either STZ or vehicle and were tested for both reference and working memories in Morris' water maze. After different survival times, rats were subjected to immunoblotting (to evaluate neurodegeneration markers) or to Fluoro-Jade C histochemistry. A marked disruption of performance in working memory was already observed after 3 hours of STZ injections. Immunoblotting analysis showed a significant increase of beta amyloid peptide expression in the amygdala, entorhinal cortex, basal ganglia, and hypothalamus. A significant increase of tau phosphorylation was also observed in the amygdala, cerebellum, cortex, basal forebrain and basal ganglia. Degenerating fibers were seen in the hypothalamus and septal area 1 day postinjection and in CA1 pyramidal neurons and close to the hippocampal dentate gyrus after 15 days. ICV injection of STZ seems therefore to produce an animal model of AD, as it reproduces the characteristic cognitive and histological changes of the disease.

Key words: Senile dementia, brain disorders, cognition disorders, metabolism disorders.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Esquema demonstrando as áreas da piscina utilizada no teste comportamental

Figura 2 Linha do tempo descritiva das fases dos testes de memórias nos animais que receberam as microinjeções (efeitos crônicos)

Figura 3 Linha do tempo descritiva das fases dos testes de memórias nos animais que receberam as microinjeções (efeitos agudos)

Figura 4 grafico da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre a glicemia de ratos alimentados *ad libitum*

Figura 5 Efeito agudo da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros da memória de operacional em ratos

Figura 6 Efeito crônico da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros da memória de referência em ratos

Figura 7 Efeito crônico da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros do resgate de memória de referência e extinção de comportamento em ratos (Teste de avaliação)

Figura 8 Efeito crônico da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros da memória operacional em ratos

Figura 9 Efeito crônico da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros da memória operacional em ratos

Figura 10 Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre a expressão do peptídeo beta-Amilóide (β A) nas diferentes estruturas encefálicas

Figura 11 Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre os níveis de fosforilação da proteína tau (tau fosforilada/tau total) nas diferentes estruturas encefálicas

Figura 12 Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre a expressão da colina acetiltransferase (ChAT) nas diferentes estruturas encefálicas

Figura 13 Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre a expressão de GFAP nas diferentes estruturas encefálicas

Figura 14 Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de *Fluoro-Jade C*

Figura 15 Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a expressão de *Fluoro-Jade C*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Esquema demonstrando as áreas da piscina utilizada no teste comportamental

Tabela 2 Resultados dos Testes de Memória de Referência no grupo de avaliação aguda).

Tabela 3 Resultados dos Testes de Memória de Referência

Tabela 4 Resultados do teste de avaliação

Tabela 5 Resultados dos Testes de Memória Operacional

Tabela 6 Resultados da comparação IET 10 X 0

Tabela 7 Expressão do peptídeo β A nas diferentes estruturas encefálicas

Tabela 8 Expressão da proteína tau nas diferentes estruturas encefálicas

Tabela 9 Expressão da proteína GFAP nas diferentes estruturas encefálicas

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM	Amígdala,
ANB	Anel B
AP	Ântero-posterior
APP	Proteína percussora do peptídeo amilóide
BA	Beta amilóide
CA1	Cornos de Amon
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
ChAT	Colina acetil-transferase
COBEA	Colégio Brasileiro para Experimentação Animal
Ct	Córtex
CT	Comprimento do trajeto
CTe	Córtex entorrinal,
CTL	Controle
DA	Doença de Alzheimer
DAE	Doença de Alzheimer esporádica
DM	Diabete Mellitus
DV	Eixo dorso-ventral
FANT	Frequência de entrada no quadrante do dia anterior
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GLUTs	Transportadores de glicose
HPC	Hipocampo,
HPT	Hipotálamo,
ICV	Intracerebroventricular
IET	Intervalo entre as tentativas
IR	Receptor de insulina
LAT	Latência
MAP	Proteína quinase ativada por mitógeno
NB	Núcleos da base,
NFTs	Emaranhados neurofibrilares
PB	Tampão fosfato
PI3	Fosfatidil-inositol 3
QD4	Quadrante quatro
QDANT	Quadrante crítico do dia anterior
STZ	Estreptozotocina
TCANT	Tempo no contador do dia anterior

Sumário

1 Introdução.....	15
1.1 <i>Doença de Alzheimer</i>	15
1.1.1 Doença de Alzheimer e sistema colinérgico	18
1.1.2 Doença de Alzheimer e células gliais	188
1.2 <i>Utilização de glicose pelo Sistema Nervoso</i>	19
1.2.1 metabolismo de glicose e Doença de Alzheimer	189
2 Objetivos.....	22
3 Material e Métodos	23
3.1. Animais	23
3.2. Análise da glicemia	23
3.3. Injeção intracerebroventricular de estreptozotocina	23
3.3.1. <i>Implante das cânulas e injeção intracerebroventricular</i>	24
3.3.2. <i>Microinjeção</i>	25
3.4. Teste comportamental	25
3.4.1. <i>Teste comportamental nos animais com cânulas (efeitos agudos)</i> . 28	
3.4.2. <i>Teste comportamental nos animais após injeção com micropipetas de vidro (efeitos crônicos)</i>	28
3.5. Westernblotting	28
3.6. Análise histoquímica do Fluoro-Jade C	31
4 Resultados.....	33
4.1 Aspectos gerais	33
4.2 Análise da glicemia	33
4.3 Teste Comportamental	34
4.3.1 Efeitos agudos da injeção de STZ sobre os teste de memória.....	37
4.3.2 Efeitos crônicos da injeção de STZ sobre os teste de memória.....	37
4.3.2.1 Memória de referência.....	37
4.3.2.2 Teste De Avaliação	39
4.3.2.3 Memória operacional (intervalo de tempo entre as tentativas de 10 minutos IET10).....	41
4.3.2.4 Intervalo de tempo entre as tentativas de 10 e 0 minutos (IET10 x IET0).....	43
4.4 Westernblotting	45
4.4.1 β -Amilóide	45
4.4.2 Razão Tau Fosforilada/Tau Total.....	48
4.4.3 Colina-Acetiltransferase	51
4.4.4 Proteína Acídica Fibrilar Glial (GFAP).....	52
4.5 Fluoro-Jade C	55

5 Discussão	57
6 Conclusões preliminares.....	67
7 Referências.....	67

1. Introdução

1.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) descrita em 1907 por Alois Alzheimer, é a causa mais comum de demência que afeta indivíduos a partir dos 60-65 anos de idade, atingindo cerca de 20 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, onde já vivem cerca de 15 milhões de indivíduos com mais de 60 anos, estima-se que o número de pessoas que desenvolverão a DA até o ano de 2025 seja de 1 milhão e 200 mil (OMS, 2010).

A DA é caracterizada clinicamente por comprometimentos cognitivos e comportamentais progressivos, como perda de memória, desorientação geográfica, deterioração da linguagem, mudanças de comportamento e complicações motoras, afetando o funcionamento ocupacional e social. Fatores genéticos e ambientais parecem contribuir para o desenvolvimento da doença, sendo a idade o principal fator de risco, e que atinge valores próximos de 40% nos grupos etários acima de 60 anos de idade. Além da idade, são apontados como fatores de risco, deficiência de fatores neurotróficos, defeito mitocondrial, acúmulo de elementos neurotóxicos, aumento na formação de radicais livres e/ou estresse oxidativo, defeito no metabolismo energético e defeitos genéticos. Neste contexto, podemos classificar a DA em dois tipos: a DA de acometimento tardio em que aparece a partir dos 60 anos de idade e que ocorre de forma esporádica (DAE), e a DA familiar de acometimento precoce ao redor de 40 anos (Kar *et al.*, 2004; Spires & Hyman, 2005).

Histologicamente a DA é caracterizada pela formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFTs) já descritos por Alzheimer e que continuam sendo utilizadas como diagnóstico pelos patologistas. As placas senis parecem resultar do metabolismo anormal da proteína precursora do peptídeo amilóide (APP), incluindo a agregação do beta amilóide (β A) e a diminuição da degradação do mesmo por proteases (Kang *et al.*, 1987). Os NFTs são formados a partir do colapso do citoesqueleto neuronal, decorrente da hiperfosforilação da proteína associada a microtúbulo tau (Radde *et al.*, 2006), e conseqüente perda neuronal com diminuição da massa encefálica.

A neurodegeneração ocorre em múltiplas regiões do encéfalo, predominantemente no hipocampo, córtex, amígdala, neocórtex, varias áreas

subcorticais, rafe dorsal e locus ceruleus (Kar *et al.*, 2004). A perda de neurônios em grande escala rompe circuitos neuronais contribuindo para o declínio cognitivo. Os neurônios piramidais das projeções corticais são particularmente vulneráveis a esta morte, rompendo conexões corticais (DeKosky *et al.*, 1990; Morrison & Hof, 1997) como, por exemplo, a conexão entre o córtex entorrinal e a formação hipocampal (Squire & Zola-Morgan, 1991). Bussiere e colaboradores (2003) demonstraram que 90% dos neurônios piramidais no córtex pré-frontal são perdidos nos estágios avançados da doença. Na região do subiculum e CA1 do hipocampo em média 70% dos neurônios morrem durante a progressão da doença (West *et al.*, 1994). Os neurônios remanescentes passam por extensivas mudanças morfológicas, entre elas distrofia neurítica, remodelação das árvores axônicas e da densidade dos espinhos dendríticos (Spires & Hyman, 2005). Todas essas mudanças alteram a conectividade dos circuitos de memória e cognição, sendo responsável pelos sintomas existentes na DA (Terry *et al.*, 1991).

As placas senis são encontradas no neocórtex, hipocampo, giro para-hipocampal, amígdala, área entorrinal, núcleo basal e tálamo anterior (Hyman *et al.*, 1986). Segundo Forlenza (2005) as alterações ocorrem desde o início da doença em estruturas do lobo temporal medial, incluindo o hipocampo e o giro para-hipocampal, estruturas consideradas essenciais para o processo de memória. Com a evolução da doença o processo degenerativo se espalha para o neocórtex, área entorrinal, amígdala, núcleo basal e tálamo anterior (Hoogendijk *et al.*, 1999; Zubenko *et al.*, 1991). Áreas límbicas e de associações corticais são mais suscetíveis do que o córtex sensorial primário. No neocórtex as camadas II e III são as mais suscetíveis para a formação de placas (Ingelsson *et al.*, 2004). Admite-se que anos antes do início da demência já ocorra deposição do peptídeo β A nestas áreas.

OS NFTs são encontrados na região CA1 do hipocampo, córtex entorrinal e neocórtex (Hyman *et al.*, 1986), e em várias áreas subcorticais incluindo amígdala, núcleo basal de Meynert, área tegmental ventral, rafe dorsal, bulbo olfatório e alguns núcleos talâmico e hipotalâmicos (Hof *et al.*, 1997; Klucken *et al.*, 2003). Braak e Braak (1997) caracterizaram a ocorrência de NFTs em diferentes regiões do encéfalo em várias idades e determinou que os NFTs formam-se primeiro em regiões transitórias e expande totalmente para o córtex

entorrinal e hipocampo. Esta progressão aumenta até interromper o sistema de memória no lobo temporal (Klucken *et al.*, 2003), contribuindo com a perda de memória. Extensiva perda neuronal ocorre no encéfalo junto com a progressão da formação de NFTs (Morrison & Hof, 1997), demonstrando que a densidade de NFTs tem relação direta com a evolução e gravidade da DA (Arriagada *et al.*, 1992; Giannakopoulos *et al.*, 2003; Ingelsson *et al.*, 2004).

1.1.1. Doença de Alzheimer e sistema colinérgico

Na DA, perdas neuronais intensificam as disfunções sinápticas e neuroquímicas. Estudos de investigação bioquímica em tecidos retirados por biópsia e autópsia evidenciam que vários sistemas de neurotransmissão, sobretudo, os sistemas colinérgico, serotoninérgico, glutamatérgico e o sistema endocanabinóide, são afetados durante a progressão da DA. (Kar *et al.*, 2004).

Racchi e colaboradores (2004) afirmam que a degeneração do sistema colinérgico é a mais dramática entre os sistemas de neurotransmissão afetados na DA. De fato, a doença cursa com a redução da função colinérgica central, principalmente em áreas límbicas e têmporo-parietais. O comprometimento do sistema colinérgico na DA foi sugerido inicialmente por observação pós-morte em encéfalos de pacientes que demonstraram problemas de memória e outros déficits cognitivos durante a vida. Na maioria dos casos, foi observada uma diminuição da enzima responsável pela síntese da acetilcolina, a colina acetiltransferase (ChAT), e perda de neurônios colinérgicos em varias áreas do encéfalo (Kar *et al.*, 2004).

O motivo da degeneração dos neurônios colinérgicos não é bem conhecido, porém existem evidências da interação entre o βA e os receptores nicotínicos de acetilcolina, principalmente a subunidade alfa7 com uma localização predominantemente pré-sináptica em terminais colinérgicos (Dineley *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Pettit *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000). Dougherty e colaboradores (2003) demonstraram que a morte de neurônios colinérgicos ocasionada pelo βA na DA envolve um aumento no influxo de Ca^{2+} , através desse subtipo de receptor.

1.1.2. Doença de Alzheimer e células gliais

A gliose também é característica na DA e à medida que a doença evolui somam-se reações gliais inflamatórias e oxidativas, aumento na ativação de astrócitos e microglias que são encontrados em abundância perto das placas (Akiyama *et al.*, 2000a, b). Estudos com modelos de camundongos transgênicos que super-expressam o peptídeo β A, demonstram que há um aumento da microglia e dos processos inflamatórios nas placas de β A que se formam no encéfalo (Frautschy *et al.*, 1998; Jantzen *et al.*, 2002; Masliah *et al.*, 1996). O β A na DA é um potente ativador de microglia, que quando ativada libera uma variedade de mediadores pró-inflamatórios os quais podem contribuir para disfunção e morte neuronal. No entanto essa ativação microglial pode ter também um papel benéfico, uma vez que podem reduzir o acúmulo de β A ao aumentar a fagocitose, remoção e degradação (Rogers, 2001; Takata *et al.*, 2007), criando um ciclo vicioso de morte celular, neuroinflamação e fagocitose.

1.2. Utilização de glicose pelo Sistema Nervoso

O transporte de glicose nas células de mamíferos é mediado por uma família de transportadores de glicose (GLUTs; *Glucose Transporter*). A expressão dos transportadores de glicose nos tecidos está ligada aos diferentes metabolismos destes, conforme a demanda e utilização a quantidade de transportadores pode variar. Cada grupo de transportadores possui propriedades cinéticas únicas, caracterizando suas funções e sua distribuição por diferentes tecidos. A maioria das células expressa um número diferente de GLUTs em proporções distintas. A família dos GLUTs é subdividida em classes: Classe I (GLUT 1-4), classe II (GLUT 5) e classe III (GLUT 6-9) (Rayner, 1996; Vanucci *et al.*, 1997, 1998).

No encéfalo, a glicose carregada pela corrente sanguínea é transportada através da barreira hematoencefálica e posteriormente para o interior das células neurais. Acredita-se que a captação da glicose e seu metabolismo passem por três etapas intermediárias entre a transferência de glicose fora dos microvasos encefálicos e sua utilização pelos neurônios (Messier, 2004).

A glicose atravessa o parênquima encefálico via GLUT 1, isoforma de alto peso molecular (55 kD). A abundância de GLUT 1 na superfície abluminal das células endoteliais e o gradiente de concentração de glicose facilitam o fluxo de

glicose do sangue para as células endoteliais. A glicose então é transportada para fora das células endoteliais no fluido encefálico extracelular. Uma porção substancial da glicose é então transportada via GLUT 1 isoforma de baixo peso molecular (45 kD) para os astrócitos que possuem prolongamentos que circulam os capilares. Finalmente, o transportador de glicose do tipo GLUT 3, presente em neurônios, possibilita o transporte da glicose do fluido extracelular para os neurônios (Messier, 2004).

O GLUT 3 é a principal proteína transportadora de glicose neuronal (Maher *et al.*, 1993; Nagamatsu *et al.*, 1992). Grande número de estudos tem examinado mudanças plásticas na expressão dos GLUTs encefálicos. Em geral estes estudos sugerem que a expressão de GLUT é plástica e consistentemente paralela às mudanças na ativação neuronal e utilização de glicose pelo encéfalo. Em roedores, o GLUT 3 possui localização principalmente encefálica. A expressão do mRNA deste transportador localiza-se em neurônios, incluindo o cerebelo, estriado, córtex e hipocampo (Nagamatsu *et al.*, 1993). Já o GLUT 2, descrito a princípio no sistema periférico, foi posteriormente também descrito no sistema nervoso, nas áreas no giro denteado do hipocampo, em diferentes núcleos do hipotálamo, complexo olivar inferior e núcleos motores (Arulison *et al.*, 2004).

Além das proteínas transportadoras de glicose citadas anteriormente, o encéfalo também possui transportadores de glicose do tipo GLUT 4 e GLUT 8, sensíveis a ação da insulina. O GLUT 4 além de estar localizado em diversos locais do organismo (Birnbaum, 1989), também é encontrado no córtex cerebral e hipocampo (Doré *et al.*, 1997). Já o GLUT 8 possui localização principalmente encefálica, ressaltando-se o hipocampo, núcleo paraventricular do hipotálamo e amígdala (Reagan *et al.*, 2001; 2002).

1.2.1. Metabolismo de glicose e Doença de Alzheimer

Vários estudos têm demonstrado o papel da glicose como principal nutriente do encéfalo, documentado seu metabolismo e controle, bem como mostrado que regiões cerebrais relacionadas com aprendizado e memória, tais como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal exibem aumento da utilização de glicose, evidenciada por estudos que utilizam técnicas de tomografia por emissão de pósitrons. Além disso, esses estudos têm indicado que a insulina afeta várias

funções cerebrais incluindo cognição e memória (Alkire *et al.*, 1998; Hoyer, 2002; Kilpatrick & Cahill, 2003; Swartz *et al.*, 1995; Talley *et al.*, 2002). Nos últimos anos, foi sugerido que a deficiência e a resistência à insulina no encéfalo podem estar relacionadas à DAE (de la Monte & Wands, 2005; Gasparini *et al.*, 2002; Hoyer *et al.*, 2004; Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006). Essa relação entre a DAE e o metabolismo de glicose encefálico tem sido considerada em parte pelo fato de pacientes com Diabetes mellitus (DM) apresentarem comprometimento cognitivo, especialmente pacientes idosos com DM tipo 2, onde o principal fator é a resistência à insulina (Biessels & Kappelle, 2005). Deste modo, hoje em dia é bem aceita a idéia de que a DAE pode ser o resultado de um estado de deficiência de insulina e resistência insulínica do encéfalo (de la Monte & Wands, 2005; Hoyer *et al.*, 2004; Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006, 2007). Apesar de a insulina ser produzida em grande parte pelas células B pancreáticas e atravessar a barreira hematoencefálica, ela pode ser também produzida localmente em algumas regiões do encéfalo como hipocampo, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e bulbo olfatório (Hoyer, 2003). Além disso, o receptor de insulina (IR) também é encontrado em várias áreas encefálicas como bulbo olfatório, hipotálamo, córtex cerebral e hipocampo (Henneberg & Hoyer, 1995).

A sinalização da insulina é mediada por duas vias de transdução: a via da quinase fosfatidil-inositol 3 (PI3 quinase) e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase) que controlam a captação de glicose pelas células (Johnston *et al.*, 2003). Além disso, a via da PI3 quinase está relacionada com a regulação dos peptídeos β A e com a fosforilação da proteína tau (Ishiguro *et al.*, 1993; Phiel *et al.*, 2003; Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006). Assim, alterações no metabolismo do β A e na fosforilação balanceada da proteína tau geradas por distúrbios das vias de sinalização da insulina poderiam acarretar na DAE.

Neste contexto, a estreptozotocina (STZ) é uma glicosamina derivada de nitrosouréia que é seletivamente tóxica às células produtoras/secretoras de insulina, sendo amplamente utilizada para induzir DM experimental em ratos com aplicação sistêmica (Szkudelski, 2001). No entanto, a STZ em baixas doses injetada intracerebroventricular (icv) não altera os níveis basais de glicose na corrente sanguínea e não induz o DM, mas parece alterar o metabolismo de glicose encefálico (Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006). Considerando a presença da insulina e dos seus receptores no sistema nervoso central e que a deficiência

nesta via de sinalização no encéfalo podem estar relacionadas à DAE e ao DM, o uso da STZ icv tem sido utilizado como um modelo experimental de indução da DAE em ratos (Biessels & Kappelle, 2005; Henneberg & Hoyer, 1995; Hoyer, 2003; Hoyer *et al.*, 2004; Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006). Este modelo, diferentemente de outros utilizando animais transgênicos (Kar *et al.*, 2004; Spires & Hyman, 2005) descritos na literatura, pode contribuir para a compreensão da DAE em humanos, por possuir várias das características da doença e mimetizar a progressiva deterioração cognitiva e do metabolismo energético encefálico (Grünblatt *et al.*, 2004). Este modelo experimental poderia dar subsídios morfológicos e moleculares para o entendimento da DAE em humanos.

2. Objetivos

Caracterizar o modelo experimental da DAE em ratos, induzido pela injeção intracerebroventricular de STZ, por meio de análises comportamentais dos possíveis déficits cognitivos e análises de proteínas marcadoras de neurodegeneração, do citoesqueleto e do sistema colinérgico tipicamente alteradas na DA.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados neste estudo ratos Wistar machos adultos (300-350g de peso), obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 hs) e com acesso livre à água e ração. O protocolo empregado está de acordo com o guia do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB/USP (Protocolo nº 033, fls. 55, livro 02).

3.2. Análise da glicemia

A medida da glicemia foi realizada em todos os animais de nosso estudo, sendo sua dosagem feita sem restrição alimentar. As dosagens foram feitas imediatamente antes das cirurgias e 15 e 30 dias após as injeções de estreptozotocina. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica estéril, uma gota de sangue foi obtida através da perfuração da ponta da cauda dos animais. Essa amostra de sangue, foi aplicada sobre a fita teste que foi introduzida para leitura no glicosímetro (*Accu-Chek Active, Roche*), sendo os resultados obtidos em mg/dL. Os valores obtidos da dosagem glicêmica foram expressos em média \pm S.E.M. e submetidos ao teste estatístico ANOVA e pós-teste Bonferroni. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

3.3. Injeção intracerebroventricular de estreptozotocina

Os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina (5 mg/100 g) e xilazina (1 mg/100 g), tiveram os pêlos raspados da superfície da cabeça e então posicionados no aparelho estereotáxico (*Kopf Instruments, Tujunga, CA*). Previamente à incisão no escalpo, os animais receberam uma injeção subcutânea de lidocaína (0,2 mL). Uma vez feita a incisão sagital da linha mediana e exposto o crânio, o ponto de cruzamento entre as suturas sagital e coronal foi marcado. Dois pequenos orifícios bilaterais foram feitos no crânio do animal com uma broca esférica de uso odontológico nas posições onde seriam feitas as injeções. A partir do bregma, foram utilizados como medidas os seguintes valores: 0,8 mm no eixo ântero-posterior (AP), 1,4 mm no eixo médio-lateral e 3,4 mm no eixo dorso-

ventral (DV) medidos a partir da superfície do encéfalo já exposto, coordenadas seguidas de acordo com Paxinos & Watson (2005).

Os animais foram separados em diferentes grupos para avaliação aguda ou crônica de possíveis alterações cognitivas através de testes de memória operacional e de referência, de níveis protéicos e de um marcador histológico de degeneração, geradas pela estreptozotocina (STZ) em relação ao grupo injetado com o veículo (CTL).

Um dos grupos de animais recebeu implantes intraventriculares de cânulas e foi injetado com STZ ou o veículo imediatamente antes de serem submetidos a testes comportamentais de memória que perduravam por até 24 horas, para avaliação temporal dos prejuízos cognitivos (efeitos agudos).

Outro grupo recebeu as injeções e foi avaliado cronicamente nos testes comportamentais por 17 dias (efeitos crônicos), bem como quanto a alterações de proteínas relacionadas à neurodegeneração e ao sistema colinérgico (30 dias após as injeções).

Um terceiro grupo de animais recebeu as injeções e foi avaliado por um método de marcação histológica de degeneração após 1, 3, 7, 15 e 30 dias.

Em todos os casos, os animais que formaram o grupo experimental (STZ) foram injetados em cada ventrículo com 4 μ L de estreptozotocina (*Merck*) diluída no veículo tampão citrato (0,295 g de citrato de sódio e 0,9 g de cloreto de sódio em 100 mL, pH = 4,5). Os animais receberam um total de 3 mg da droga/kg de animal.

Os animais do grupo controle (CTL) foram injetados com o veículo sem a droga, obedecendo-se os mesmos volumes utilizados para a injeção nos animais do grupo experimental.

3.3.1. Implante das cânulas e injeção intracerebroventricular

No caso do grupo de animais implantados com cânulas, é importante ressaltar, que os mesmos foram submetidos aos testes comportamentais de memória de referência previamente ao implante das cânulas (ver item 3.4.1). Após esse período, e seguindo-se à incisão do escalpo, a calota craniana foi exposta e totalmente seca, e o periósteo raspado visando uma boa adesão do polímero acrílico dental (Artigos Odontológicos Clássico Ltda., Campo

Limpo, SP) responsável pela fixação das cânulas a serem implantadas nos orifícios da calota craniana. A superfície do osso foi cauterizada quando necessário. Além disso, dois parafusos de relojoaria foram também fixados nas proximidades para oferecer uma maior superfície de adesão ao material acrílico. As cânulas, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (23G) de 13 mm de comprimento e após a retirada da região contendo o bisel, foram então implantadas nos ventrículos laterais através dos orifícios e fixadas com o material acrílico. Após um período de recuperação da cirurgia de implante das cânulas, seguido de um período de testes comportamentais prévios às injeções (± 10 dias), a microinjeção da droga ou do veículo foi realizada utilizando-se uma seringa Hamilton de 5 μ L acoplada a um tubo de polietileno de mais ou menos 50 cm de comprimento contendo a droga ou o veículo, que por sua vez era acoplado a uma agulha gengival para ser introduzida na cânula guia. O uso do tubo de polietileno, incorporado às cânulas dos animais permitiam que as injeções fossem realizadas com os animais despertos, sem a necessidade de anestésiar ou conter o animal, e de modo a manter sua livre atividade na gaiola durante a injeção. Os animais foram então avaliados no labirinto aquático de Morris.

3.3.2. Microinjeção

No caso do grupo de animais injetados e testados cronicamente, foram usadas micropipetas de vidro com pontas entre 10 e 20 μ m preenchidas com 4 μ L de STZ ou do veículo, inseridas através dos orifícios na calota craniana e seus conteúdos injetados com o uso de um sistema de injeção por pressão (*Picospritzer*).

3.4. Teste comportamental

Os animais foram submetidos a testes comportamentais no labirinto aquático de Morris para que fosse avaliado o estado de suas memórias de referência e operacional. O labirinto aquático consiste em uma piscina redonda de fibra de vidro preta, com 200 cm de diâmetro e 50 cm de altura, preenchida com água (26 ± 1 °C) a uma altura de aproximadamente 25 cm. À água foi adicionado leite (250 ml), com a finalidade de que a água se tornasse opaca. Uma plataforma de plástico transparente com 9 cm de diâmetro, montada sob uma coluna também de

plástico, foi posicionada na piscina de forma que ficasse por volta de 2 cm abaixo do nível da água.

Uma câmera de vídeo colocada aproximadamente a 290 cm acima do centro da piscina foi conectada a um dispositivo de rastreamento digital (VP112, HVS Image Ltd, Hampton., UK). O traçado percorrido pelo animal ao nadar foi amostrado em unidades de 0,1 segundos por um programa de computador que coletava e analisava o padrão do nado.

A piscina foi teoricamente dividida em quatro quadrantes iguais. A porcentagem de tempo gasto pelo animal no quadrante onde a plataforma estava localizada durante as sessões de treinamento indica comportamento de orientação. A piscina foi também dividida em anéis concêntricos de 33 cm de largura (sendo “A” o anel interno, “B” o anel intermediário e “C” o anel externo). A porcentagem de tempo gasto em cada anel foi usada como indicativos de estratégias de procura. Como forma mais específica de se avaliar o comportamento de orientação, delimitaram-se circunferências de 27 cm de diâmetro concêntricas às possíveis posições da plataforma, ao que se denominou contador, procedendo-se a uma avaliação do tempo relativo gasto na região crítica quando comparado ao tempo gasto nos outros contadores (Figura 1).

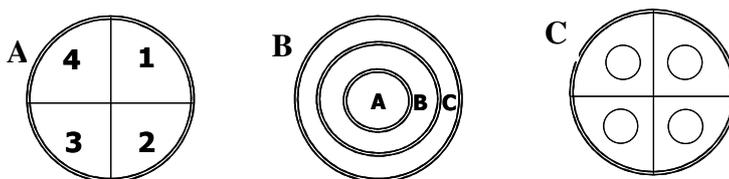


Figura 1. Esquema demonstrando as áreas da piscina utilizada no teste comportamental (labirinto aquático de Morris) e suas divisões, sendo **A** divisão dos quatro quadrantes, **B** divisão dos três anéis concêntricos e **C** os quatro contadores.

Os parâmetros de memórias de referência e operacional analisados estão resumidos na tabela abaixo (Tabela1).

Tabela 1. Parâmetros do comportamento de memórias de referência e operacional avaliados.

LAT	Latência	Tempo gasto para o animal achar a plataforma.
CT	Comprimento do trajeto	Tamanho do trajeto percorrido pelo rato
QD4	Quadrante quatro	Porcentagem de tempo que o animal permanecia no quadrante critico (quatro).
ANB	Anel B	Porcentagem de tempo que o animal permanecia no anel critico (B).
QDANT	Quadrante critico do dia anterior	Porcentagem de tempo que o animal permanecia no quadrante critico do dia anterior.
TCANT	Tempo no contador do dia anterior	Porcentagem de tempo relativo* que ao animal permanecia no contador critica do dia anterior.
FANT	Frequência	Frequência de entrada no contador critico do dia anterior.

*Considera-se como 100% a soma dos tempos gasto nos quatro contadores.

A piscina se encontrava em uma sala de 3,15 X 4,5 m em cujas paredes apresentavam-se fixados diversos objetos salientes que serviam como pistas de orientação espacial.

O teste consistia em posicionar o animal perto da lateral da piscina, virado para a parede em uma das posições iniciais, e permitir que ele nadasse livremente até que a plataforma fosse encontrada. Os dados começavam a ser coletados pelo computador assim que o animal era colocado na água, e, no instante em que a plataforma fosse encontrada, encerrava-se a coleta de dados, indicando o fim da tentativa. Se o rato não encontrasse a plataforma dentro de 2 minutos, ele era guiado manualmente até a plataforma, onde permanecia por um período de 10 a 15 segundos. Os animais eram retirados da água e devolvidos às suas respectivas caixas, onde permaneciam até a próxima tentativa. O intervalo entre as tentativas (IET) padrão utilizado foi de 10 minutos.

Os testes comportamentais aplicados avaliaram tanto a memória de referência, quanto a memória operacional do animal.

3.4.1. Teste comportamental nos animais com cânulas (efeitos agudos)

O grupo de animais implantados com cânulas intraventriculares foi submetido aos testes comportamentais de memória de referência previamente ao implante das cânulas durante 5 dias, com o intuito de avaliar a homogeneidade dos animais quanto ao desempenho no aprendizado do teste. Após o período de recuperação da cirurgia de implante das cânulas, os animais foram submetidos a mais 3 dias de testes de memória de referência e 1 dia no teste de avaliação, que visaram avaliar possíveis prejuízos decorrentes do implante da cânula e no desempenho sensorio-motor. Após esse teste de avaliação, os animais foram testados quanto à memória operacional por 2 dias para aprender a tarefa e então seguiu-se a divisão dos animais em dois grupos, que só então foram submetidos ao teste final de avaliação da memória operacional após 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h e 24h da microinjeção da droga ou do veículo (Figura 2).

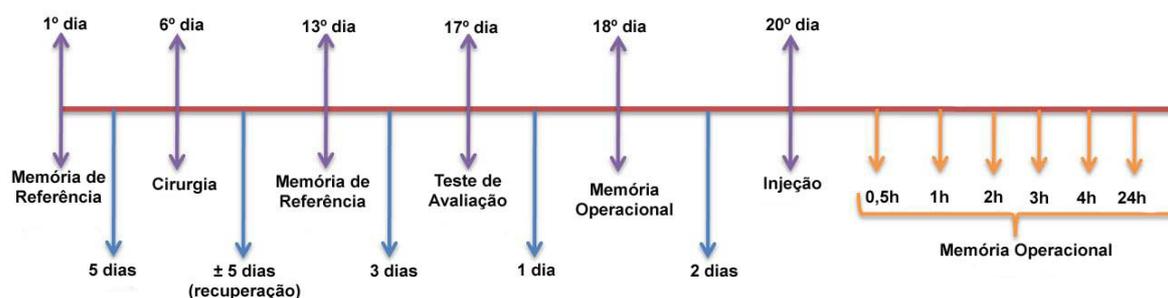


Figura 2. Linha do tempo descritiva das fases dos testes de memórias nos animais implantados com cânulas (efeitos agudos).

3.4.2. Teste comportamental nos animais após injeção com micropipetas de vidro (efeitos crônicos)

Após a recuperação da cirurgia para as injeções intracerebroventriculares, os animais foram avaliados cronicamente (por 17 dias), nos testes comportamentais de memórias de referência e operacional. A seqüência de realização dos testes durante esse período consistiu em: memória de referência (7 dias), teste de avaliação (1 dia), memória operacional com intervalos entre

tentativas de 10 minutos (IET10; 4 dias) e memória operacional com intervalos entre tentativas de 0 minuto (IET0; 1 dia) (Figura 3).

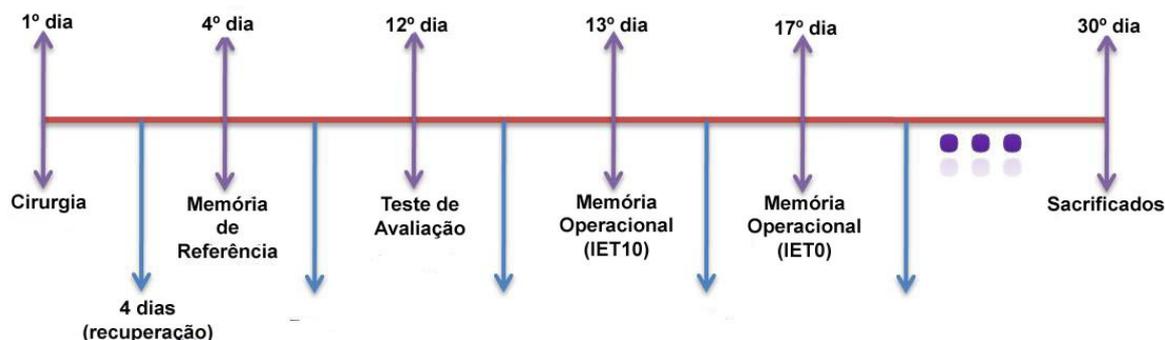


Figura 3. Linha do tempo descritiva das fases dos testes de memórias nos animais que receberam as microinjeções (efeitos crônicos). IET = intervalo entre as tentativas.

De maneira mais detalhada, na versão do teste de memória de referência a plataforma permanecia em uma posição fixa no centro do quadrante noroeste (quadrante 4). As posições iniciais onde os ratos eram soltos variavam aleatoriamente entre os pontos cardeais e sub-cardeais sudoeste, sul, sudeste e leste em cada dia de teste. Após a avaliação da memória de referência, um teste de avaliação foi realizado e consistia em um treino de tentativa única com duração de 3 minutos, no qual não havia uma plataforma submersa. O objetivo do teste de avaliação é basicamente verificar a existência de algum problema motor, além de possibilitar a elucidação de dúvidas com relação à aquisição, retenção e resgate de memória.

A próxima etapa consistiu na avaliação do desempenho dos animais na versão do teste de memória operacional, em que a localização da plataforma era trocada diariamente. Quatro posições (tentativas) iniciais foram usadas em diferentes ordens a cada dia, sendo que o intervalo entre cada tentativa era de 10 minutos. Na primeira tentativa de cada dia de avaliação da memória operacional o animal encontrava a plataforma por acaso ou por métodos de varredura, ou não achavam e eram então conduzidos à plataforma manualmente. No entanto, ao fim

da primeira tentativa os animais deveriam reter informações sobre a localização da plataforma para que então as pudesse utilizar nas próximas tentativas.

Por fim, no décimo terceiro dia de testes, os animais foram submetidos a uma versão modificada do teste de memória operacional, versão na qual o intervalo entre as tentativas foi reduzido a zero.

Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo grupo (STZ e CTL) como fator entre-sujeitos, e dia (1 a 7) e tentativa (1 a 4) como fatores intra-sujeitos (Xavier et al., 1999, 2009)

3.5. Westernblotting

Os animais avaliados cronicamente nos testes comportamentais foram sacrificados por decapitação após 30 dias das injeções intracerebroventriculares, seus encéfalos removidos e regiões como o córtex, hipocampo, hipotálamo, prosencéfalo basal, amígdala, núcleos da base e cerebelo, foram dissecadas e rapidamente coletadas e homogeneizadas em tampão de extração (Tris, pH 7,4, 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 10%, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM). As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12.000 g, o sobrenadante separado e dosado quanto ao conteúdo protéico usando-se uma solução para ensaio colorimétrico (*Bio-Rad; Hercules, CA, USA*).

As amostras (50-100 µg de proteína) contendo tampão *Laemmli* (azul de bromofeno 0,1%, fosfato de sódio 1 M, pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%) foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida e após a separação eletroforética, as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm de diâmetro). Após a transferência, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários disponíveis comercialmente: anticorpo policlonal feito em coelho anti-beta amilóide (βA, Santa Cruz Biotechnology), anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-tau total parte (C-terminal, aminoácidos 243–441, Sigma), anticorpo policlonal feito em coelho anti-tau fosforilada (pSER^{199/202}, Sigma), anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-GFAP (Sigma) e anticorpo policlonal feito em cabra anti-colina-acetiltransferase (ChAT, Chemicon), como indicadores de neurodegeneração ocorridas na DA, depois com anticorpos secundários anti-camundongo, anti-coelho ou anti-cabra conjugados

com peroxidase e a ligação específica do anticorpo revelada utilizando um kit quimioluminescente. Finalmente, as bandas foram analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade usando-se o programa Scion Image 4.0.2 (Scion Corporation; Frederick, MD, USA).

Os valores obtidos da densitometria óptica foram expressos em média \pm S.E.M. e submetidos ao teste t (*Student*) para amostras independentes. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. Para melhor visualização das diferenças, os resultados da análise estatística foram, então, convertidos em valores percentuais em relação ao grupo controle (considerado 100%).

3.6. Análise histoquímica do Fluoro-Jade C

Utilizamos um método de marcação fluorescente, com Fluoro-Jade C, que se liga especificamente a neurônios em degeneração (Schmued & Hopkins, 2000).

Após 1, 3, 7 e 15 dias da injeção icv de STZ e veículo os animais foram profundamente anestesiados com quetamina e xilazina e perfundidos por via transcardíaca com salina tamponada e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4). Após 4 horas de pós-fixação, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose a 30% em PB para a crioproteção. Cortes coronais (30 μ m) dos encéfalos congelados foram obtidos (utilizando-se um micrótomo deslizante de congelação) e coletados em PB e montados em lâminas gelatinizadas.

As lâminas gelatinizadas contendo os cortes foram deixadas em placa quente para secar e foram então colocados em uma solução de álcool 80% contendo 1% de NaOH por 5 minutos. Em seguida, foram colocados em álcool 70% por 2 minutos e em água destilada por mais 2 minutos. Após o processo de reidratação o material foi incubado em uma solução de 0,06% de permanganato de potássio por 10 minutos, sob agitação, para diminuição do ruído de fundo. O material foi então lavado em água destilada por 2 minutos e incubado com uma solução de *Fluoro-Jade C* (*Chemicon*) em ácido acético por 20 minutos. Após a incubação com o *Fluoro-Jade C*, o material foi lavado por 3 vezes em água destilada, deixado por cerca de 20 minutos em estufa para secar, tratado com xilol

por 2 vezes de 3 minutos e coberto com lamínula usando-se DPX (*Fluka, Milwaukee, WI, USA*). Finalmente, o material foi analisado em microscópio de fluorescência.

4. Resultados

4.1. Aspectos gerais

Nossos resultados, em geral, demonstram que a STZ injetada icv, parece promover declínio de memória observado nos testes comportamentais agudos e crônicos. Esse declínio pode ser o resultado da morte neuronal observada nas avaliações histológicas pelo método de Fluoro-Jade C, que indicaram uma neurodegeneração região-específica e tempo-específica. Foram observadas também mudanças na expressão de proteínas que estão relacionadas à DA, e que são utilizadas para diagnóstico positivo da doença, entre elas o peptídeo β A e a fosforilação da proteína tau, da enzima de síntese da acetilcolina, a ChAT e da proteína astrocítica GFAP.

4.2. Análise da glicemia

Foi comparado o nível da glicemia dos animais antes e depois das injeções de STZ e veiculo, e cada animal foi o seu próprio controle. Não houve diferença do nível da glicemia após as injeções icv de STZ quando comparado ao nível antes das injeções. Também não foi observada nenhuma mudança nos níveis glicêmicos quando comparamos os animais STZ com os animais controles (Figura 4).

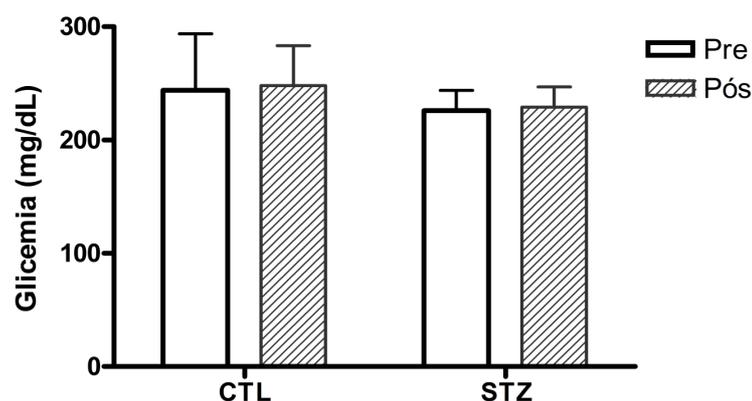


Figura 4. Efeitos da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre a glicemia de ratos alimentados *ad libitum*. Os valores glicêmicos foram avaliados antes (Pré) e após (Pós) a injeção do veículo (CTL) ou estreptozotocina (STZ). Resultados expressos em média \pm S.E.M. (ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

4.3. Teste Comportamental

Em todo o teste comportamental, o parâmetro velocidade da natação não demonstrou diferença significativa entre o grupo controle e experimental. Assim podemos afirmar que as diferenças nos outros parâmetros não são causadas por deficiência motora e motivacional.

4.3.1. Efeitos agudos da injeção de estreptozotocina sobre os testes de memória

Os resultados dos testes de memória de referência são mostrados na Tabela 2.

Os testes de memória de referência realizados durante 5 dias antes da canulação, mostraram uma curva de aprendizado normal e homogênea em todos os parâmetros avaliados. Após a cirurgia de canulação, os mesmos testes aplicados por mais 3 dias e 1 dia de teste de avaliação, confirmaram a equivalência entre o desempenho pré e pós-cirurgia. O teste de memória operacional aplicado na seqüência por 2 dias para o aprendizado da tarefa demonstrou que todos os animais foram capazes de aprende-la.

Após a injeção de STZ os testes de memória operacional aplicados demonstraram que após ½ h, 1 h ou 2 hs, não houve diferenças significativas no desempenho desses animais comparados aos do grupo controle, em nenhum dos parâmetros observados.

Por outro lado, um declínio da memória foi observado a partir de 3 horas da injeção de STZ, em comparação ao grupo controle. Os animais do grupo STZ obtiveram um pior desempenho no parâmetro latência, isto é, eles demoraram mais para achar a plataforma ou não a encontraram (Figura 5). Também observamos após 3 horas da injeção de STZ no parâmetro comprimento do trajeto, um declínio da memória, isto é, os animais do grupo STZ nadaram um percurso maior até achar a plataforma (Figura 5). Esses resultados se mantiveram nos períodos mais longos do teste comportamental (4 e 24 horas após a injeção).

Tabela 2. Resultados dos Testes de Memória de Referência no grupo de avaliação aguda.

	<i>Grupo</i>		<i>Fase</i>		<i>Fase/Tentativa/grupo</i>		<i>Fase/grupo</i>	
	<i>F 1, 10</i>	<i>P</i>	<i>F 7,7</i>	<i>P</i>	<i>F 21,21</i>	<i>P</i>	<i>F 7,7</i>	<i>P</i>
LAT	10,42	0,0091	6,14	0,0002	2,62	0,0054	12,82	<0,0001
Comp	18,27	0,0016	3,84	0,0014	---	----	8,17	<0,0001

Continuação

	<i>Fase/Tentativa</i>		<i>Tentativa</i>		<i>Tentativa/grupo</i>	
	<i>F 21,21</i>	<i>P</i>	<i>F3,3</i>	<i>P</i>	<i>F 3,3</i>	<i>P</i>
LAT	3,84	0,0001	81,69	<0,0001	5,38	0,0051
Comp	1,92	0,0113	36,39	36,39	2,99	0,0464

Memória de Operacional

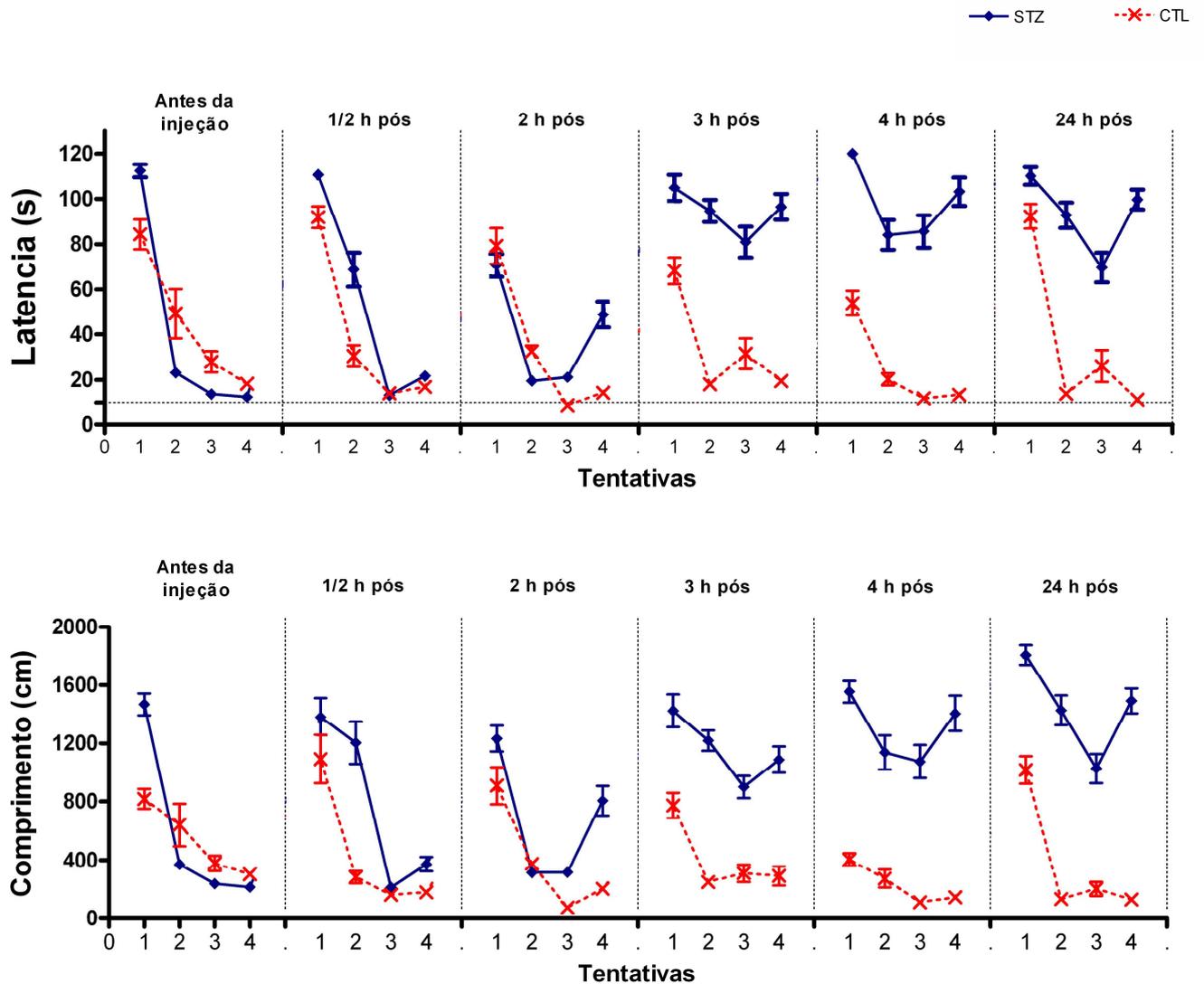


Figura 5. Efeito agudo da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros da memória operacional em ratos. A média dos valores obtidos foi usada para expressar o desempenho em termos de latência e comprimento do trajeto. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo sessões (antes da injeção, 1/2 h pós, 2 h pós, 3 h pós, 4 h pós e 24 h pós) como fator intra-sujeitos, e grupo (STZ e CTL) como fator entre-sujeitos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4.3.2. Efeitos crônicos da injeção de estreptozotocina sobre os testes de memória

4.3.2.1. Memória de Referência

Os resultados dos testes de memória de referência são mostrados na Tabela 3. Em relação aos parâmetros Latência (LAT), Comprimento do trajeto (CT), Porcentagem de tempo no quadrante 4 (QD4) e Porcentagem de tempo no anel B (ANB), a análise revelou a existência de efeito significativo para o fator grupo ($F_{1,16} = 9,64-25,08$; $P < 0,05$) e na interação dia/grupo ($F_{6,96} = 2,63-4,62$; $P < 0,05$). Em relação aos parâmetros LAT, QDC e ANB, a análise revelou a existência de efeito significativo em relação ao fator Dia ($F_{6,96} = 2,93-8,93$; $P < 0,008$). Em relação aos parâmetros LAT e CT, a análise estatística confirmou presença de efeito significativo em relação ao fator Tentativa ($F_{3,48} = 8,43-13,37$; $P < 0,05$). Por fim, em relação aos parâmetros LAT, a análise revelou a existência de efeito significativo em relação à interação tentativa/grupo ($F_{3,48} = 5,08$; $P = 0,0112$). De fato, a Figura 6 ilustra que enquanto os animais do grupo controle exibiram uma redução da LAT (Figura 6A), do CT (Figura 6B), e um aumento da QD4 (Figura 6C) e do ANB (Figura 6D) ao longo dos dias de testes, os animais do grupo STZ exibiram redução tardia tanto na LAT quanto no CT, bem como aumento igualmente tardio ou inconsistente na porcentagem de tempo no quadrante e anel críticos.

Tabela 3. Resultados dos Testes de Memória de Referência no grupo de avaliação crônica.

	<i>Grupo</i>		<i>Dia</i>		<i>Tentativa</i>		<i>Dia/ Grupo</i>		<i>Tentativa/ Grupo</i>	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
LAT	25,08	0,0001	8,93	0,0001	8,43	0,0010	4,62	0,0004	5,08	0,0112
CT	10,60	0,0050	-----	-----	13,37	0,0001	3,42	0,0087	-----	-----
QD4	16,60	0,0009	3,91	0,0079	2,77	0,0517**	3,84	0,0086	-----	-----
ANB	9,64	0,0068	2,93	0,0185	2,78	0,0610**	2,63	0,0309	-----	-----

Memória de Referência

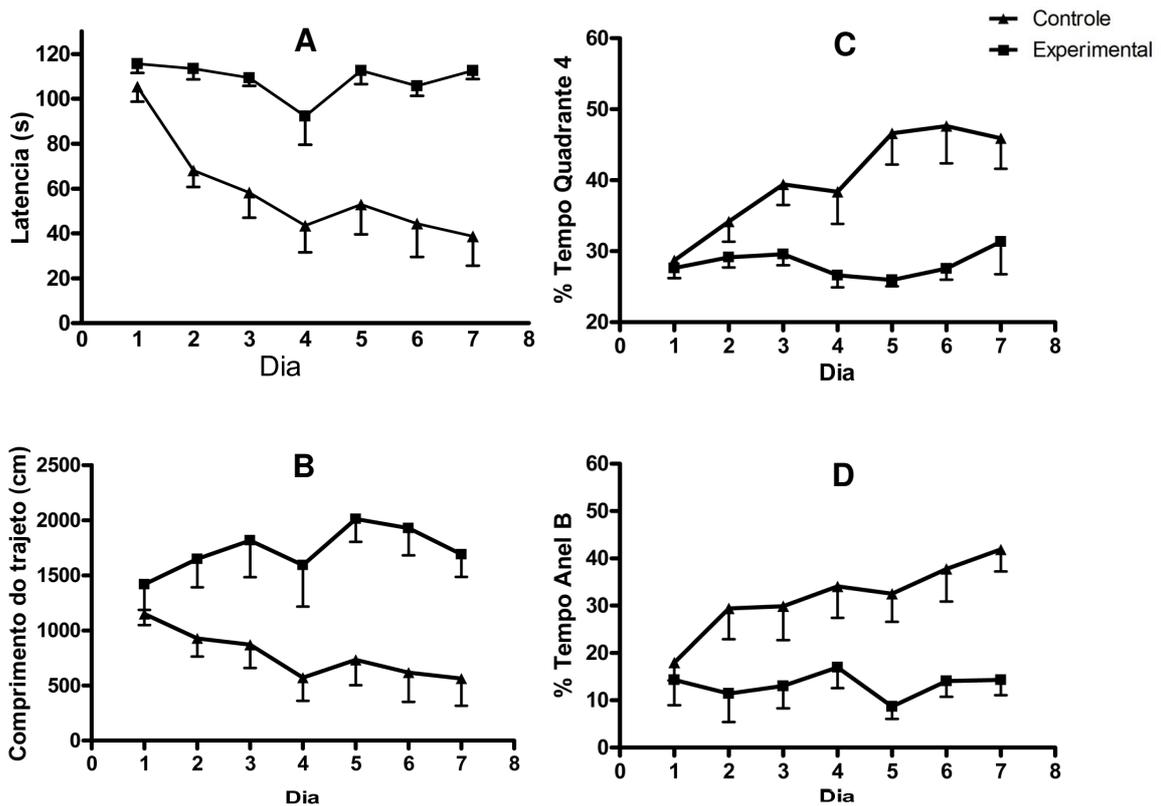


Figura 6. Efeito crônico da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros da memória de referência em ratos. A média dos valores obtidos em quatro tentativas em cada sessão (\pm erro padrão da média das tentativas de um mesmo grupo) foi usada para expressar o desempenho em termos de latência (A), comprimento do trajeto (B), porcentagem de tempo no quadrante 4 (C) e porcentagem de tempo no anel B (D). Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo grupo (STZ e CTL) como fator entre-sujeitos, e dia (1 a 7) e tentativa (1 a 4) como fatores intra-sujeitos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4.3.2.2. Teste de Avaliação

Os resultados referentes ao teste de avaliação são mostrados na Tabela 4. A análise estatística mostrou existência de efeito significativo de grupo para os parâmetros Porcentagem de tempo gasto no contador crítico 4 (TC4) ($F_{1,7} = 20,07$; $P=0,0029$) e Frequência de entrada no contador crítico 4 (F4) ($F_{1,7} = 8,95$; $P=0,0202$).

De fato, ao observarmos os gráficos desses parâmetros (Figura 7A e 7B, para TC4 e F4, respectivamente), percebemos que o grupo controle vasculha preferencialmente no primeiro minuto a área onde se encontrava a plataforma durante todo o teste de referência. É igualmente claro que esse comportamento é gradativamente extinto no segundo e terceiro minutos. Já o grupo experimental não destinou especial atenção à região onde se encontrava a plataforma nos dias anteriores no primeiro minuto. Ao passar do tempo, no entanto, podemos perceber um sutil aumento da frequência e tempo despendidos à região crítica.

Tabela 4. Resultados do teste de avaliação

	<i>Grupo</i>	
	<i>F 1,7</i>	<i>P</i>
TC4	20,07	0,0029
F4	8,95	0,0202

TC4- Tempo no contador crítico (4)

F4- Frequência de entrada no contador crítico (4)

Teste de Avaliação

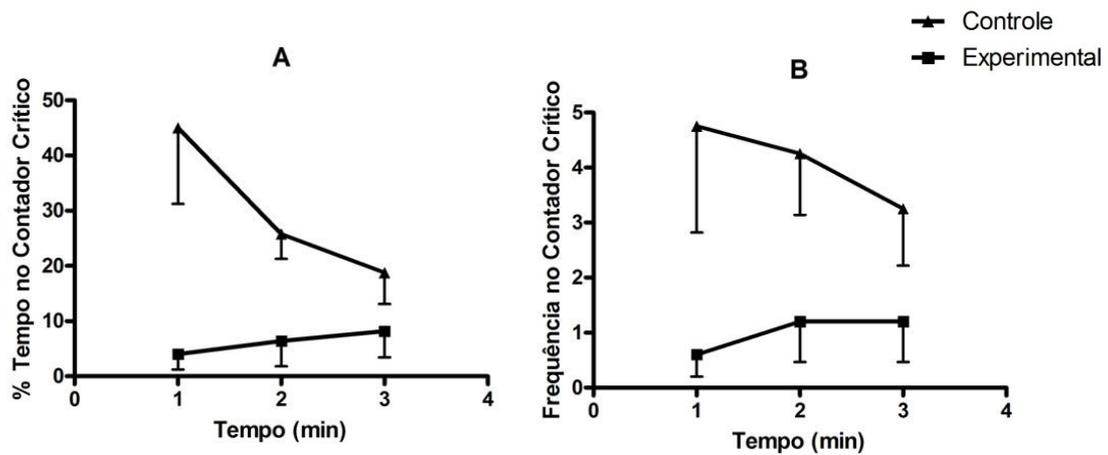


Figura 7. Efeito crônico da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros do resgate de memória de referência e extinção de comportamento em ratos (Teste de avaliação). A média dos valores obtidos em uma tentativa (\pm erro padrão da média) foi usada para expressar o desempenho em termos de porcentagem de tempo no contador crítico (A) e frequência de entrada no contador crítico (B). Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo grupo (STZ e CTL) como fator entre-sujeitos, e dia (1 a 7) e tentativa (1 a 4) como fatores intra-sujeitos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4.3.2.3. Memória Operacional (Intervalo de tempo entre as tentativas de 10 minutos (IET10))

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que, para os parâmetros CT, Percentagem de tempo gasto no quadrante crítico do dia anterior (QDANT), Percentagem de tempo gasto no contador crítico do dia anterior (TCANT) e Freqüência de entrada no contador crítico do dia anterior (FANT), a análise revelou existência de efeito significativo para Tentativa ($F_{3,42} = 7,07-14,63$; $P < 0,001$), para os parâmetros QDANT, TCANT e FANT a existência de efeito significativo para a interação Tentativa/Grupo ($F_{3,42} = 3,27-9,67$; $P < 0,04$) e para o parâmetro CT, efeito de grupo ($F_{1,14} = 16,34$; $P = 0,0012$).

Observando a Figura 8, podemos claramente observar que o grupo controle apresentou uma queda no comprimento do trajeto percorrido em função das tentativas, enquanto o grupo STZ não apresentou melhoras (Figura 8A). Com relação aos parâmetros QDANT (Figura 8B), TCANT (Figura 8C) e FANT (Figura 8D), percebe-se que há um padrão que unifica os resultados. As análises desses parâmetros refletem uns aos outros, todos mostrando que, enquanto o grupo controle despende bastante tempo de sua primeira tentativa no quadrante ou contador onde se encontrava a plataforma no dia anterior, extinguindo esse comportamento de forma crescente na segunda, terceira e quarta tentativas, o grupo experimental não dedica especial atenção à localização da plataforma do dia anterior, passando pelas regiões críticas em percentagem igual a que se esperaria em uma exploração totalmente aleatória.

Tabela 5. Resultados dos Testes de Memória Operacional (IET10) no grupo de avaliação crônica.

	Grupo		Tentativa		Tentativa/Grupo	
	F 1,14	P	F 3,42	P	F 3,42	P
CT	16,34	0,0012	14,63	0,0001	-----	-----
QDANT	-----	-----	7,07	0,0010	3,27	0,0357
TCANT	3,26	0,0924*	10,85	0,0001	9,67	0,0001
FANT	-----	-----	9,81	<0,0001	5,56	0,0027

Memória Operacional (IET10)

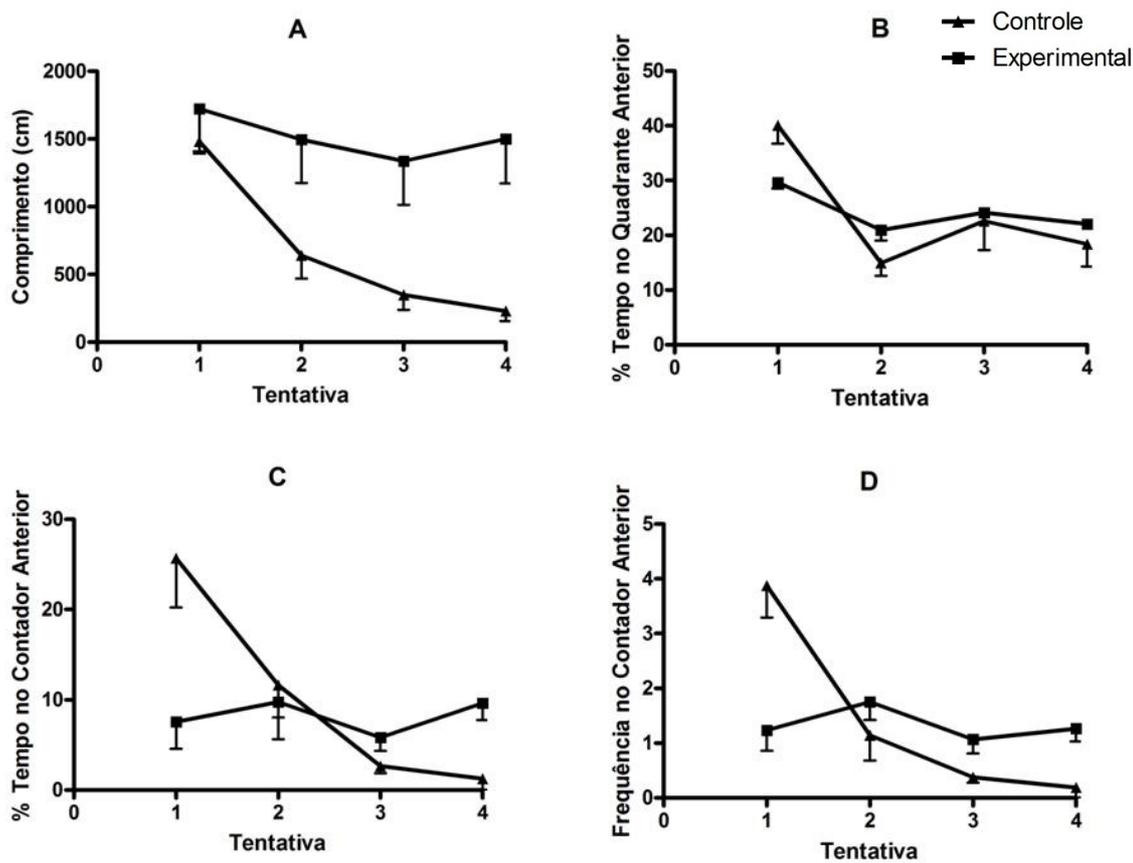


Figura 8. Efeito crônico da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros da memória operacional em ratos. A média dos valores obtidos em cada tentativa nos quatro dias (\pm erro padrão da média das mesmas tentativas) foi usada para expressar o desempenho em termos de comprimento do trajeto (A), porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior (B), porcentagem de tempo no contador crítico do dia anterior (C) e frequência de entrada no contador do dia anterior (D). Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo grupo (STZ e CTL) como fator entre-sujeitos, e dia (1 a 7) e tentativa (1 a 4) como fatores intra-sujeitos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4.3.2.4. Intervalo de tempo entre as tentativas de 10 e 0 minutos (IET10 X IET0)

Na Tabela 6 vemos os resultados da análise dos dados referentes ao teste aplicado com IET igual a 0. A análise revelou existência de efeito significativo de grupo e tentativa para os parâmetros LAT e CT.

Ao compararmos os gráficos de Latência (Figura 9A) e Comprimento de Trajeto (Figura 9B) podemos ver que os dois grupos se assemelham bastante no que diz respeito à melhora da execução da tarefa quando o Intervalo entre as tentativas foi igual a 0. Vemos claramente que o grupo experimental praticamente não apresentou melhora quando utilizamos IET 10 e, no entanto, quando utilizamos IET 0, a melhora já mencionada foi observada.

Tabela 6. Resultados da comparação IET 10 X 0.

	<i>Grupo</i>		<i>Tentativa</i>		<i>Tentativa/ Grupo</i>	
	<i>F 1,14</i>	<i>P</i>	<i>F 1,14</i>	<i>F 1,14</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
LAT	13,86	0,0023	13,86	13,86	3,52	0,0230
CT	16,34	0,0012	14,63	0,0001	-----	-----

Memória Operacional (IET 10 X IET 0)

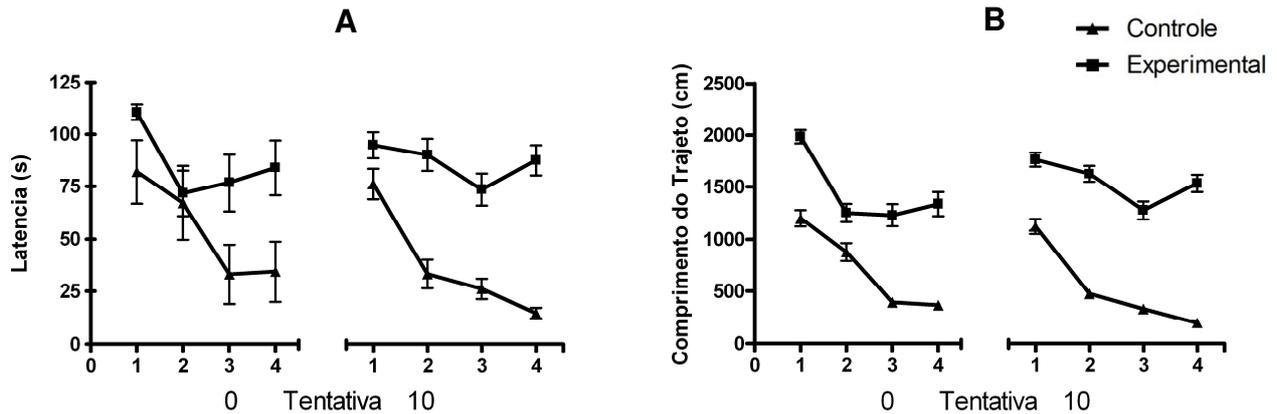


Figura 9. Efeito crônico da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina em diferentes parâmetros da memória operacional em ratos. A média dos valores obtidos em cada tentativa nos quatro dias (\pm erro padrão da média das mesmas tentativas) foi usada para expressar o desempenho em termos de latência (A) e comprimento do trajeto (B) com intervalos de 0 e 10 minutos entre cada tentativa. Para análise dos dados, utilizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) tendo grupo (STZ e CTL) como fator entre-sujeitos, e dia (1 a 7) e tentativa (1 a 4) como fatores intra-sujeitos. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4.4. Westernblotting

As análises estatísticas da expressão das proteínas consideraram os valores absolutos obtidos pela densitometria óptica que são apresentados nas tabelas e os valores relativos convertidos em porcentagens aparecem descritos no texto e nas tabelas.

4.4.1. β -Amilóide

A análise dos níveis de expressão do peptídeo β A demonstrou haver um significativo aumento no grupo STZ quando comparado ao controle na maioria das estruturas encefálicas analisadas. Os resultados estão resumidos na Tabela 7.

No córtex entorrinal (Figura 10A) dos encéfalos dos animais STZ houve um aumento de 40,7% ($P=0,0089$) da expressão do β A quando comparados com os animais controle. Níveis semelhantes de alterações foram observados nos núcleos da base (Figura 10B), com um aumento de 41,8% ($P=0,0063$) na expressão da proteína β A no grupo STZ em relação ao grupo controle. Outras estruturas, no entanto, apresentaram diferenças de expressão mais marcantes como a amígdala (Figura 10C) que apresentou um aumento de 135,81% ($P=0,0107$) e o hipotálamo (Figura 10D) onde houve um aumento de 86,6% ($P=0,0001$) na expressão do peptídeo nos encéfalos dos animais STZ quando comparados com os animais controle.

Já estruturas como hipocampo, cerebelo, córtex e prosencéfalo basal, não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, de forma que os níveis de expressão de β A tanto dos animais do grupo controle quanto dos animais do grupo STZ mostraram-se os mesmos ou muito próximos.

Tabela 7. Expressão do peptídeo β A nas diferentes estruturas encefálicas.

Estruturas	Dados absolutos	n	%	P
CTe	CTL 7482 \pm 617.5	4	40,7	0,0089
	STZ 10530 \pm 510.0	4		
NB	CTL 11140 \pm 795.8	7	41,8	0,0063
	STZ 15800 \pm 1163	7		
AM	CTL 4557 \pm 1274	4	135,81	0,0107
	STZ 10750 \pm 1116	4		
HPT	CTL 6683 \pm 520.4	6	86,6	0,0001
	STZ 12470 \pm 480.1	4		
HPC	CTL 1.073 \pm 0.1415	4	-	-
	STZ 1.738 \pm 0.2970	4		
CT	CTL 13990 \pm 824.8	4	-	-
	STZ 14960 \pm 1075	4		

Dados absolutos e relativos (porcentagem) das análises de densidade óptica da expressão do peptídeo β A, nos animais controle (CTL) e estreptozotocina (STZ). Os dados foram obtidos como médias dos números absolutos da densidade óptica \pm S.E.M. e submetidos ao teste t (*Student*) para amostras independentes. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. CTe = córtex entorrinal, NB = núcleos da base, AM = amígdala, HPT = hipotálamo, HPC = hipocampo, CT = córtex.

β -Amilóide

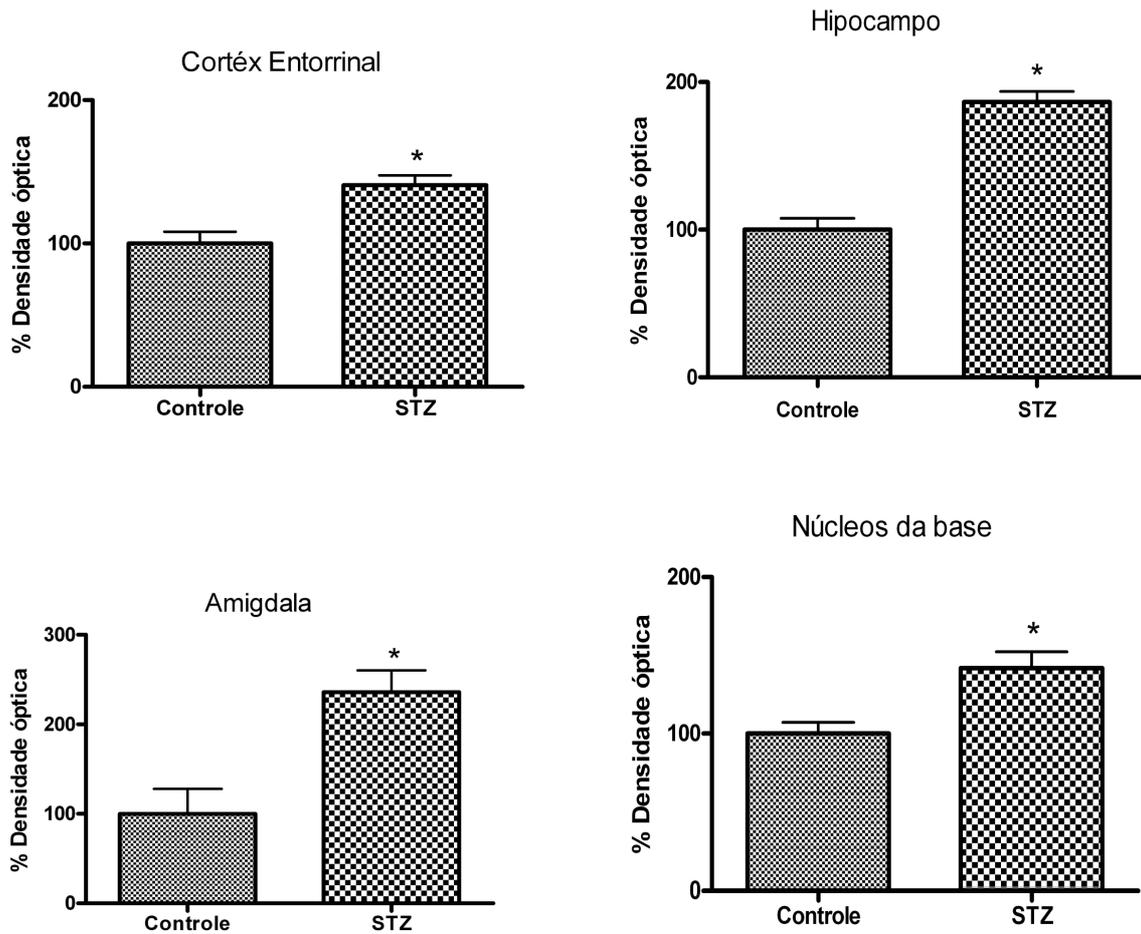


Figura 10. Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre a expressão do peptídeo beta-Amilóide (β A) nas diferentes estruturas encefálicas. Os extratos proteicos (50-100 μ g) foram separados em gel SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e estas, incubadas com anticorpo anti- β A. Os resultados são expressos como valores percentuais em relação ao grupo controle (considerado 100%), obtidos a partir dos valores absolutos da densitometria óptica. O nível de significância adotado após o teste t (*Student*) para amostras independentes foi de $*P < 0,05$.

4.4.2. Razão Tau Fosforilada/Tau Total

Nós observamos um aumento da imunorreatividade da proteína tau total (proteína tau total parte C-terminal, aminoácidos 243–441), e da tau fosforilada (tau fosforilada em serina S^{199/202}) em algumas áreas do encéfalo dos animais injetados com STZ (resultados não demonstrados). Para a análise da fosforilação da proteína tau, foi avaliada a razão entre os níveis de proteína tau fosforilada em relação aos níveis de proteína tau total. Resultados resumidos na Tabela 8.

No córtex entorrinal (Figura 11A), nós observamos uma diminuição de 43,88% ($P=0,0052$) na fosforilação da proteína tau nos animais STZ comparados aos animais controle. Já os dados referentes ao cerebelo (Figura 11B), mostram um aumento de 56,4% ($P=0,0438$) nos níveis de fosforilação da proteína nos animais STZ, em relação ao grupo controle. Um efeito similar foi observado no córtex (Figura 11C) que apresentou um aumento de 63% ($P=0,0212$) na fosforilação da proteína tau nos animais STZ quando comparados aos animais controle. Outras estruturas, no entanto, apresentaram níveis de fosforilação da tau mais marcantes como a amígdala (Figura 11D) com um aumento de 312% ($P=0,0039$) e os núcleos da base (Figura 11E) com um aumento de 298,7% ($P=0,0407$) nos animais STZ em relação aos animais controles. A estrutura que apresentou o nível de fosforilação da proteína tau mais impressionante foi o prosencéfalo basal (Figura 11F) com um aumento de 1.436,01% ($P=0,0251$). Outras estruturas, por outro lado, não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, como o hipocampo e o hipotálamo.

Tabela 8. Expressão da proteína tau nas diferentes estruturas encefálicas.

Estruturas	Dados absolutos	n	%	P
CTe	CTL 1.347 ± 0.1327	6	43,88**	0,0052
	STZ 0.7560 ± 0.07380	5		
CB	CTL 1.121 ± 0.08663	6	56,4	0,0438
	STZ 1.753 ± 0.2795	5		
CT	CTL 2.587 ± 0.5204	5	63	0,0212
	STZ 4.218 ± 0.3161	6		
AM	CTL 1.332 ± 0.1380	5	312	0,0039
	STZ 5.488 ± 1.106	4		
NB	CTL 0.9800 ± 0.1896	6	298,7	0,0407
	STZ 3.908 ± 1.489	4		
PB	CTL 0.3567 ± 0.1313	3	1.436	0,0251
	STZ 5.480 ± 1.462	3		
HPC	CTL 1.073 ± 0.1415	4	-	-
	STZ 1.738 ± 0.2970	4		
HPT	CTL 1.823 ± 0.2400	4	-	-
	STZ 2.403 ± 0.7150	5		

Dados absolutos e relativos (porcentagem) das análises de densidade óptica da expressão da proteína tau nos animais controle (CTL) e estroptozotocina (STZ). Os dados foram obtidos como médias dos números absolutos da densidade óptica ± S.E.M. e submetidos ao teste t (*Student*) para amostras independentes. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. **Diminuição de expressão do grupo STZ em relação ao controle. CTe = córtex entorrinal, NB = núcleos da base, AM = amígdala, HPT = hipotálamo, HPC = hipocampo, CT = córtex.

Tau

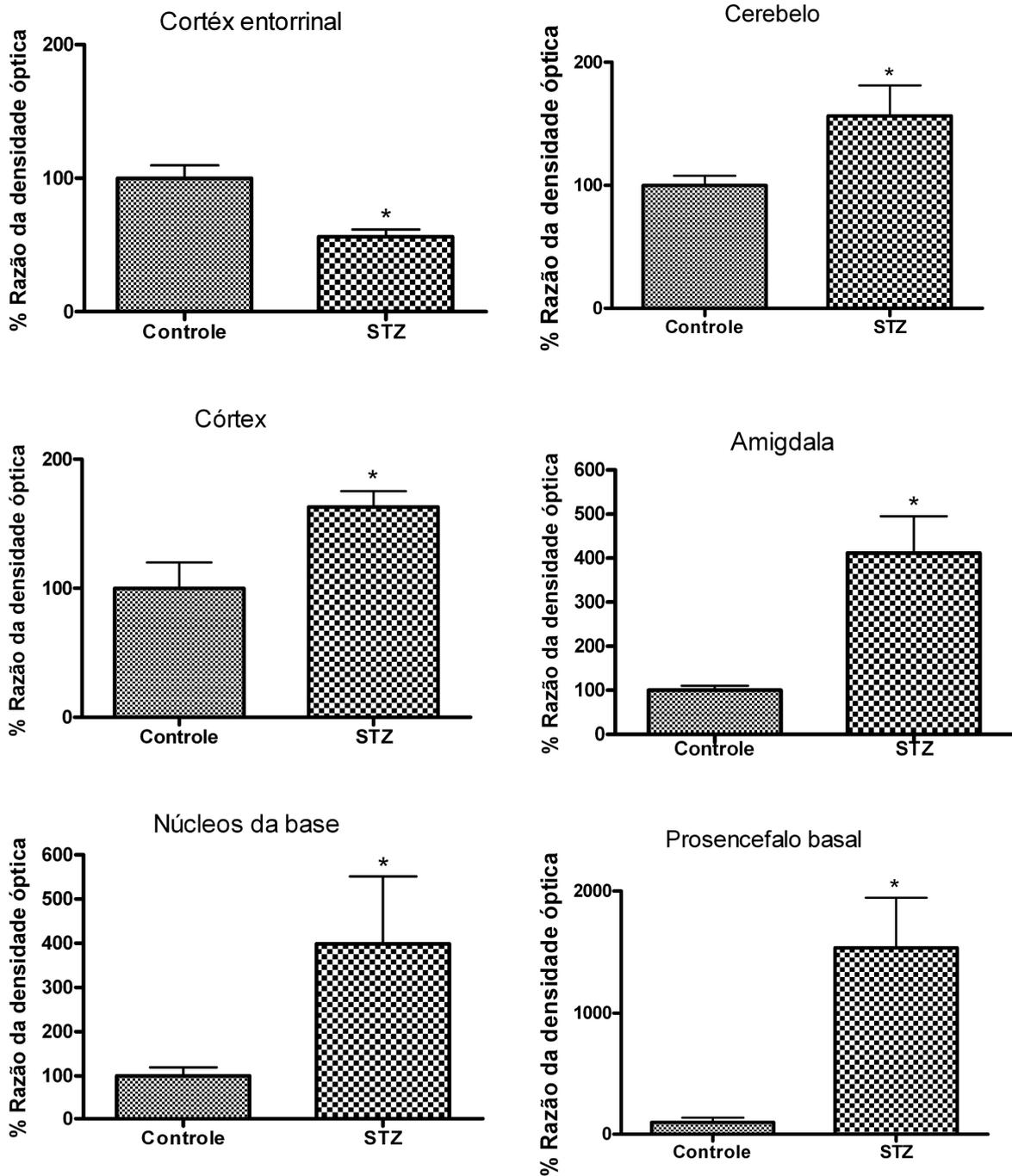


Figura 11. Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre os níveis de fosforilação da proteína tau (tau fosforilada/tau total) nas diferentes estruturas encefálicas. Os extratos proteicos (50-100 μ g) foram separados em gel SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e estas, incubadas com anticorpo anti- β A. Os resultados são expressos como valores percentuais em relação ao grupo controle (considerado 100%), obtidos a partir dos valores absolutos da densitometria óptica. O nível de significância adotado após o teste t (*Student*) para amostras independentes foi de $P < 0,05$.

4.4.3. Colina-Acetiltransferase

A amígdala (Figura 12) foi a única estrutura entre as estudadas que demonstrou uma diminuição significativa, de 75,05% ($P=0,0251$), na expressão da ChAT nos animais STZ ($n = 6$) em relação ao grupo controle ($n = 6$). Todas as outras estruturas analisadas demonstraram uma expressão equivalente comparando os dois grupos.

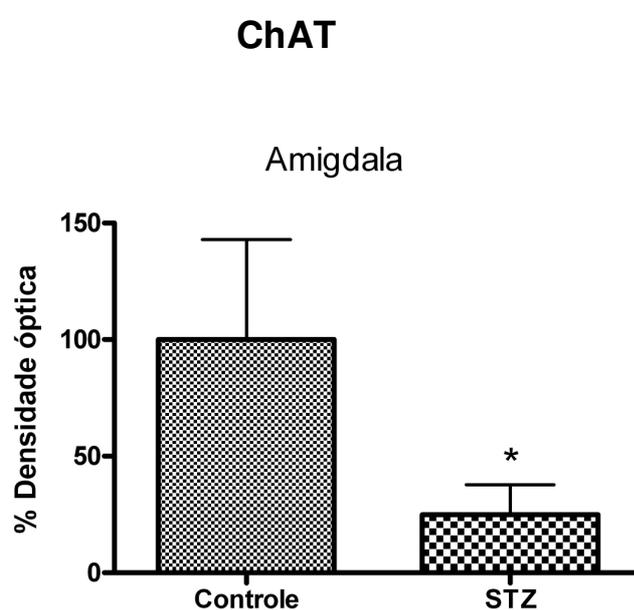


Figura 12. Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre a expressão da colina acetiltransferase (ChAT) nas diferentes estruturas encefálicas. Os extratos proteicos (50-100 μg) foram separados em gel SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e estas, incubadas com anticorpo anti- βA . Os resultados são expressos como valores percentuais em relação ao grupo controle (considerado 100%), obtidos a partir dos valores absolutos da densitometria óptica. O nível de significância adotado após o teste t (*Student*) para amostras independentes foi de $*P<0,05$.

4.4.4. Proteína Acídica Fibrilar Glial (GFAP)

Para a proteína GFAP a análise dos níveis de expressão demonstrou haver um significativo aumento no grupo STZ quando comparado ao controle na maioria das estruturas encefálicas analisadas. Os resultados estão resumidos na Tabela 9.

Um aumento marcante, de 284,9% ($P=0,0003$) na expressão de GFAP, foi observado no córtex (Figura 13A) do grupo STZ quando comparados com os animais controle. Níveis grandes também de alterações foram observados nos núcleos da base (Figura 13B), com um aumento de 162,80% ($P=0,0271$) e no hipocampo (Figura 13C) de 205,71% ($P=0,004$). Por outro lado, o córtex entorrinal (Figura 13D) apresentou uma significativa diminuição de 71,86% ($P=0,0010$) na expressão da proteína nos animais STZ comparados aos controles. Na amígdala e no hipotálamo não houve diferença entre os dois grupos na expressão da proteína GFAP.

Tabela 9. Expressão da proteína GFAP nas diferentes estruturas encefálicas.

Estruturas	Dados absolutos	n	%	P
CT	CTL 4980 ± 190.0	2	284,9	0,0003
	STZ 19170 ± 153.5	2		
NB	CTL 3942 ± 663.6	6	162,80	0,0271
	STZ 10360 ± 2836	4		
HPC	CTL 4448 ± 702.7	5	205,71	0,0040
	STZ 13600 ± 1364	4		
CTe	CTL 15620 ± 1011	3	71,86 **	0,0010
	STZ 4395 ± 842.3	3		
AM	CTL 12310 ± 2768	6	-----	0,4646
	STZ 9022 ± 3180	4		
HPT	CTL 12220 ± 2805	6	-----	0,9126
	STZ 12680 ± 2639	4		

Dados absolutos e relativos (porcentagem) das análises de densidade óptica da expressão da proteína GFAP nos animais controle (CTL) e estroptozotocina (STZ). Os dados foram obtidos como médias dos números absolutos da densidade óptica ± S.E.M. e submetidos ao teste t (*Student*) para amostras independentes. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$. **Diminuição de expressão do grupo STZ em relação ao controle. CT = córtex, NB = núcleos da base, HPC = hipocampo, CTe = córtex entorrinal, AM = amígdala, HPT = hipotálamo.

GFAP

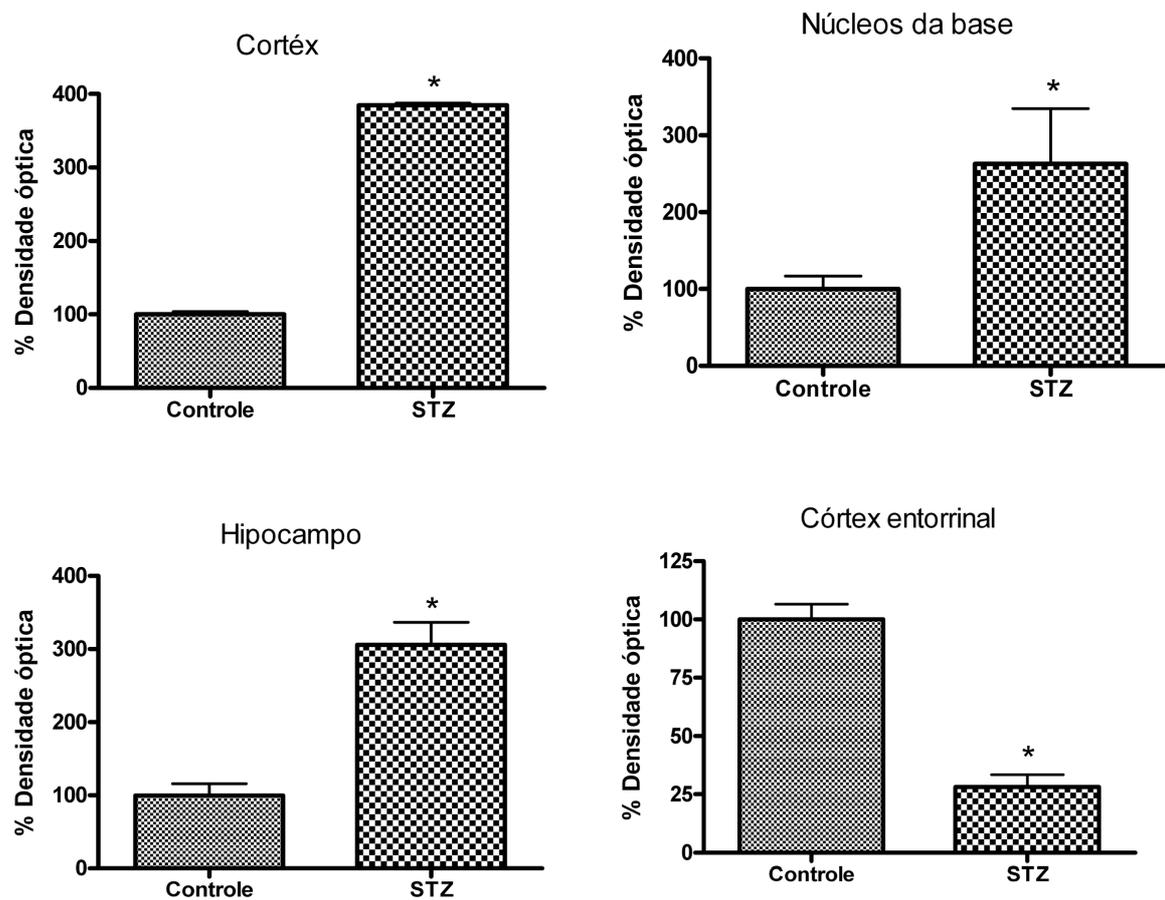


Figura 13. Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre a expressão de GFAP nas diferentes estruturas encefálicas. Os extratos proteicos (50-100 µg) foram separados em gel SDS-PAGE, transferidos para membrana de nitrocelulose e estas, incubadas com anticorpo anti-βA. Os resultados são expressos como valores percentuais em relação ao grupo controle (considerado 100%), obtidos a partir dos valores absolutos da densitometria óptica. O nível de significância adotado após o teste t (*Student*) para amostras independentes foi de * $P < 0,05$.

4.5. Fluoro-Jade C

O método de Fluoro-Jade C foi utilizado para evidenciar um possível processo de neurodegeneração nos animais experimentais. A marcação histológica de Fluoro Jade C, foi observada em terminais axonais, visto em forma de marcações de fibras e em corpos celulares nos animais do grupo experimental sugestivas de neurodegeneração. Além disso, esses resultados diferiram tendo uma característica região-específica e tempo-específica.

Após 1 dia da injeção de STZ, observamos marcação de fibras em degeneração no hipotálamo, próximo ao ventrículo (Figura 14A e 14B), área septal (Figura 14C e 14D) e no hipocampo (Figura 14E e 14F). Já após 15 dias da injeção de STZ, foram observados corpos celulares e fibras marcadas parecendo ser neurônios piramidais da camada CA1 do hipocampo (Figura 15A e 15B) e no estriado (Figura 15C e 15D). Observamos em menor quantidade fibras em degeneração nos neurônios e nas fibras próximas do giro denteado e ao córtex entorrinal (resultados não mostrados) após a injeção de STZ.

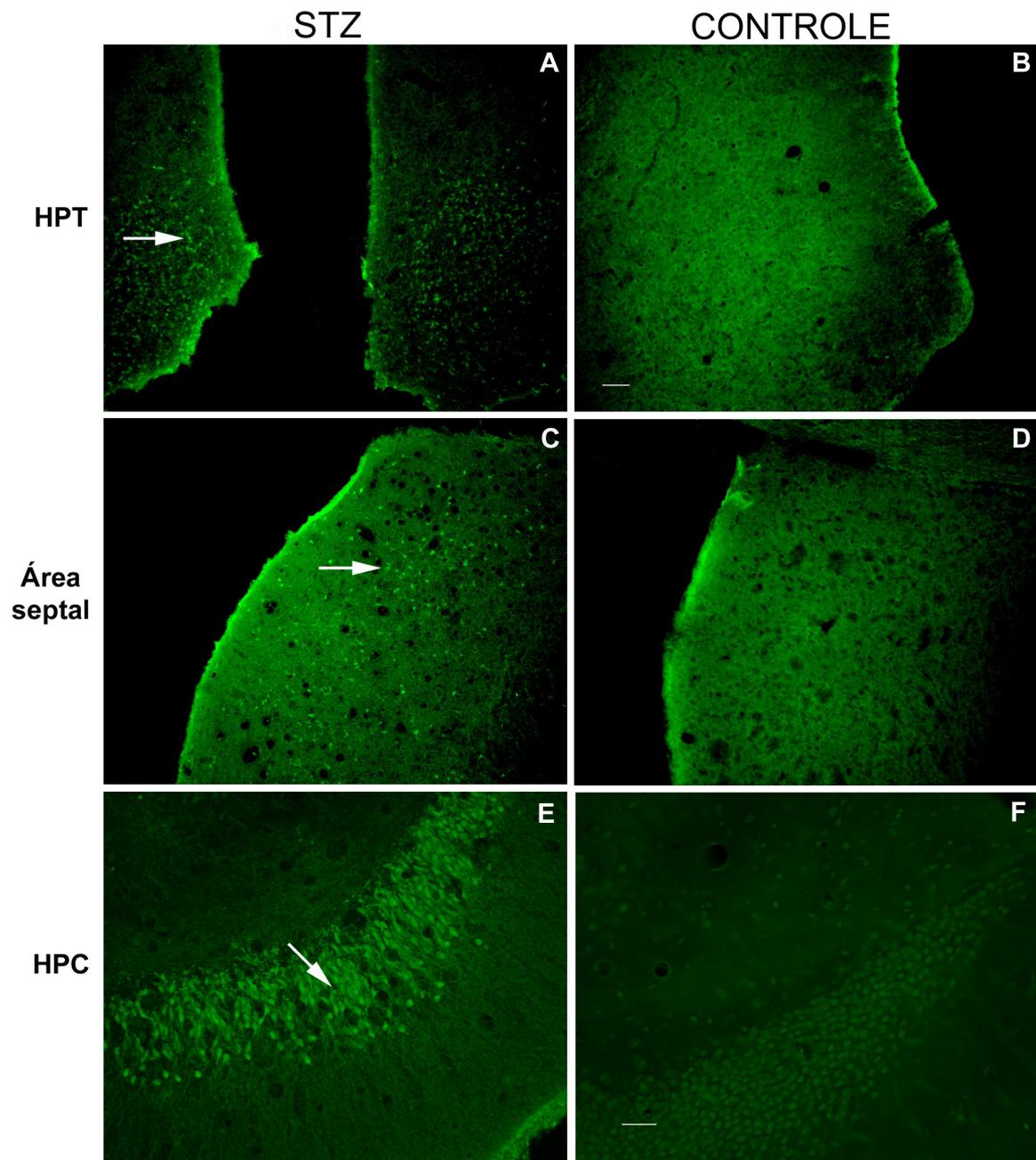


Figura 14. Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a marcação de *Fluoro-Jade C* 1 dia após a injeção intracerebroventricular de STZ.. **(A)** Marcação no hipotálamo, **(C)** na área septal e **(E)** na área CA1 do hipocampo após 1 dia da injeção. **(B)**, **(D)** e **(F)** referem-se aos respectivos controles. Notar os núcleos bem marcados (setas) no encéfalo do grupo STZ. Barra de escala em B = A = C = D = 20 μ m. Barra de escala em F = E = 50 μ m.

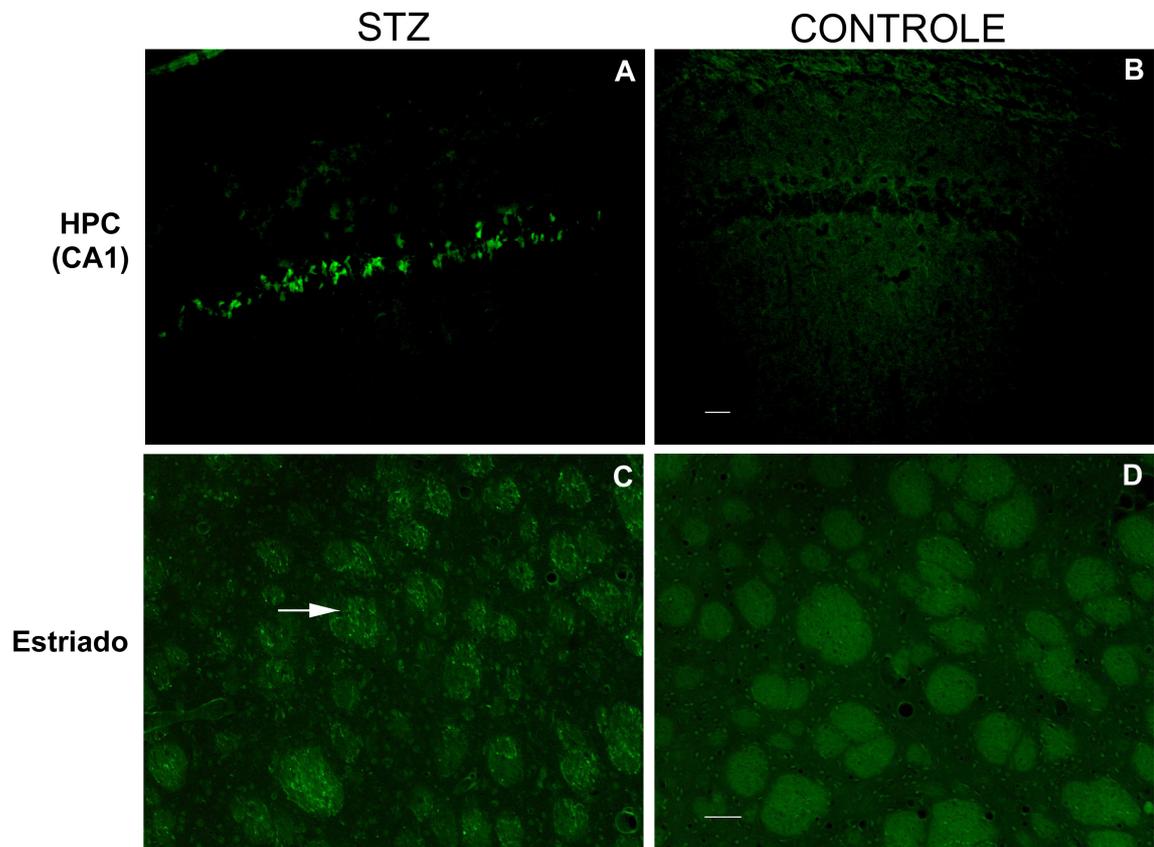


Figura 15. Imagens digitais de cortes coronais de encéfalo de rato, ilustrando a marcação de *Fluoro-Jade C* 15 dias após a injeção intracerebroventricular de STZ.. **(A)** Marcação na área CA1 do hipocampo e **(C)** no estriado. **(B)** e **(D)** referem-se aos respectivos controles. Notar corpos celulares marcados na área CA1 do hipocampo (setas) no encéfalo do grupo STZ. Barra de escala em B = A = 20 μ m. Barra de escala em D = C = 50 μ m.

5. Discussão

A estreptozotocina (STZ) possui estrutura química muito semelhante à glicose, possuindo como diferença apenas uma única substituição da hidroxila em C2 por um grupo nitrosuréia. Tal semelhança torna possível que a droga seja carregada para dentro da célula através do transportador de glicose GLUT 2 (Leloup *et al.*, 1994). É uma droga tóxica às células pancreáticas produtoras/secretoras de insulina (Wilson & Leiter, 1990) e aos receptores de insulina (Kadowaki *et al.*, 1984), aparentemente por mecanismos distintos. Por este motivo, a STZ quando aplicada sistemicamente, tem sido amplamente utilizada para gerar lesões das células β pancreáticas induzindo Diabetes *mellitus* (DM) experimental do tipo I e II em ratos (Arulmozhi *et al.*, 2004; Szkudelski, 2001; Takada *et al.*, 2007).

Apesar de a insulina ser produzida em grande parte pelas células β pancreáticas e atravessar a barreira hemato-encefálica, ela pode ser também produzida localmente em algumas regiões do encéfalo como hipocampo, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e bulbo olfatório (Hoyer, 2003). O receptor de insulina (IR) também é encontrado em várias áreas encefálicas como bulbo olfatório, hipotálamo, córtex cerebral e hipocampo (Henneberg & Hoyer, 1995). Vários estudos têm indicado, ainda, que a insulina afeta várias funções cerebrais incluindo cognição e memória (Alkire *et al.*, 1998; Hoyer, 2002; Kilpatrick & Cahill, 2003; Swartz *et al.*, 1995; Talley *et al.*, 2002). É importante ressaltar também que apesar do GLUT 3 ser considerado como o principal transportador de glicose neuronal (Maher *et al.*, 1993), o GLUT 2 descrito a princípio no sistema periférico, foi posteriormente também descrito no sistema nervoso, nas áreas no giro denteado do hipocampo, em diferentes núcleos do hipotálamo, complexo olivar inferior e núcleos motores (Arluison *et al.*, 2004). Neste contexto, a injeção intracerebroventricular de STZ tem sido utilizada nas últimas duas décadas como forma de perturbar o metabolismo de glicose encefálico, gerando um modelo de deficiência da sinalização da insulina e de resistência insulínica do encéfalo, o que poderia ter uma relação com a Doença de Alzheimer esporádica (DAE) (de la Monte & Wands, 2005, 2006; Gasparini *et al.*, 2002; Hoyer *et al.*, 2004; Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006). Este modelo animal apresenta características comportamentais e moleculares similares às encontradas em humanos. Em

ambos os casos, essas características incluem perda de memória progressiva, deficiência no metabolismo de glicose encefálica, estresse oxidativo, aumento da fosforilação da proteína tau, aumento de astrócitos, aumento da proteína beta-Amilóide (β A) e perda dos neurônios principalmente os colinérgicos, entre outras (Hyman *et al.*, 1986; Li & Hölscher, 2007; West *et al.*, 1994;).

A administração icv da droga pode ter ação restrita aos neurônios e células gliais que expressam o transportador de glicose do tipo 2 (GLUT 2) ou que expressam receptores de insulina, provocando uma lesão mais pontual e característica, ou pode provocar neurodegeneração generalizada, se puder alcançar o ambiente intracelular através de outros transportadores. De fato, mais pesquisas sobre o transporte de STZ para dentro dos neurônios ainda precisam ser realizadas. Porém, a STZ pode ter uma diferente ação nos neurônios em relação aos tecidos periféricos, levando em conta que o pré- tratamento com inibidores de GLUT 2 de ratos injetados icv com STZ ainda apresentam uma deficiência de memória, igualmente aos ratos que somente receberam STZ (Grünblatt *et al.*, 2007). Isso sugere que pode haver uma diferença entre os mecanismo dos GLUTs periféricos e centrais ou que a STZ pode ser carregada para dentro das células também por outros GLUTs, pelo menos nos neurônios. De qualquer forma, é importante ressaltar que como trabalhos anteriores demonstraram (Biessels *et al.*, 2005; Henneberg *et al.*, 1995; Salkovic-Petrisic *et al.*, 2006), nós não observamos alterações nos níveis basais de glicose na corrente sanguínea nos animais que receberam STZ em baixas doses.

As pesquisas com STZ no SNC são relativamente novas e ainda não se sabe muito sobre a forma de ação da droga. Na realidade ainda não se sabe exatamente como a STZ entra no neurônio. Uma vez dentro da célula, sabe-se que a STZ provoca liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Szkudelski *et al.*, 2001). Essas espécies reativas podem ser a causa de dois processos fisiopatológicos paralelos e distintos que expliquem a sua forma de ação e que parecem ocorrer em regiões e períodos distintos do encéfalo. Como observamos uma um visível declínio cognitivo nos testes comportamentais de memória e aprendizagem apenas 3 horas após a injeção de STZ, podemos supor que o primeiro processo fisiopatológico atinja as células do hipocampo que são mais suscetíveis ao dano provocado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Podemos imaginar que de alguma forma isto faça com que os neurônios do

hipocampo tenham suas funções prejudicadas, degenerando depois de algum tempo. De fato, a partir de 1 dia da injeção de STZ nós observamos neurônios em degeneração nesta região e que persiste em períodos mais longos como, por exemplo, até 15 dias. Um dos motivos para a maior sensibilidade das células do hipocampo frente a espécies reativas de oxigênio pode ser a presença de grandes quantidades de receptores de potencial transiente nessa estrutura (Yamamoto *et al.*, 2007) que deflagram a morte da célula quando essas espécies químicas atingem concentrações elevadas. A presença desses receptores regulados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que participam no processo de neurodegeneração já foi demonstrada no hipocampo (Yamamoto *et al.*, 2007). Já em outras regiões do encéfalo as espécies reativas também causam dano. Porém, podemos inferir neste caso que em menor escala, já que apresentam menores quantidades desses receptores, de forma que os seus efeitos sobre as vias metabólicas envolvidas com a β A e a tau poderiam se manifestar, dando tempo de provocar a deposição de placas de β A e hiperfosforilação da tau após períodos mais longos após a injeção de STZ. Apesar disso, observamos também neurônios em degeneração em regiões como hipotálamo e área septal após 1 dia da injeção do STZ, o que não poderia ser explicado pelas quantidades de receptores de potencial transiente nessas estruturas. No entanto, essa degeneração precoce observada, pelo menos no hipotálamo, poderia ser explicada pela presença de GLUT 2 nessa estrutura (Arluison *et al.*, 2004).

Em um segundo processo fisiopatológico mais persistente e que parece ocorrer em outras regiões encefálicas, nas quais a morte neuronal ocorre de forma menos pronunciada, as EROs podem provocar efeitos na cascata de sinalização intracelular de insulina, o que culminaria na formação de placas de β A e emaranhados neurofibrilares de tau fosforilada. A produção de EROs facilita a sinalização de uma resposta dependente de fosforilação de tirosina (caso do receptor de insulina) (Meng *et al.*, 2004). A permanência nesse estado facilitado pode culminar, após algum período, na inibição da própria via de sinalização de insulina. Heide e colaboradores (2006) demonstraram que excessivo estímulo ao receptor de insulina provoca decréscimo na sensibilidade de vias metabólicas intrínsecas. Nossos resultados vão de acordo com essa hipótese, pois não observamos processos degenerativos nas outras estruturas estudadas como, por

exemplo, nos núcleos da base e na amígdala, onde não observamos neurodegeneração após períodos curtos da injeção de STZ, porém observamos aumento da quantidade do peptídeo β A e da fosforilação da proteína tau após 30 dias da injeção. Dessa forma explicar-se-ia como a STZ e as EROs, poderiam provocar as alterações metabólicas que culminariam com a formação das lesões características da DA. Grünblatt e colaboradores (2007) descreveram que comparado ao hipocampo e ao córtex, o hipotálamo dos ratos que receberam 1 mg/kg STZ icv não apresentou diferenças significativas na expressão de proteínas relacionadas a fosforilação do receptor de insulina após 3 meses da injeção, e discute que esta área do encéfalo parece não ter sido afetada pela injeção da STZ, apesar de ser a região com maior expressão de GLUT-2. Como já mencionado anteriormente, nossos resultados sugerem haver um processo neurodegenerativo no hipotálamo demonstrado pela marcação de Fluoro-Jade C observada a partir de 1 dia da injeção de STZ. É importante ressaltar, no entanto, que os níveis de expressão das proteínas estudadas por Grünblatt e colaboradores (2007), eram bem menores na região do hipotálamo quando comparados às outras estruturas, inclusive nos animais controle. Esse resultado pode significar que essa região já apresentava um processo degenerativo a curto prazo, com uma menor quantidade de células remanescentes que talvez explique a ausência de efeitos gerados pela STZ. Quando observamos os animais após 15 dias da injeção não mais observamos marcação indicadora de processos degenerativos no hipotálamo, mas macroscopicamente esta área aparece menor com um simultâneo aumento da área do 3º ventrículo. Esses resultados corroboram com Shoham e colaboradores (2003) que também observaram um aumento da área do 3º ventrículo após 60 dias da injeção de STZ.

A descrição da deficiência de memória em animais que receberam STZ intracerebroventricular já é bem documentada na literatura (Grünblatt et al., 2007; Lannert et al., 1998; Sharma e Gupta, 2002). Porém, em nossos estudos analisamos a memória de referência e memória operacional em vários tempos depois da injeção de STZ. Observamos nesses testes que apenas 3 horas após à injeção de STZ, os animais já apresentaram um visível prejuízo da memória operacional. Estes ratos não encontraram a plataforma na primeira tentativa, sendo que o tempo de intervalo da última exposição foi de apenas 1 hora, e não demonstraram melhora nas tentativas subseqüentes. É muito difícil, em se

tratando deste modelo, relacionar os efeitos comportamentais, principalmente os obtidos pelo período de curto tempo, com a neurodegeneração de áreas específicas do encéfalo, uma vez que a toxicidade seletiva da droga não é muito bem esclarecida no sistema nervoso central. A longo prazo, os animais que receberam a STZ tiveram um grande prejuízo na execução das tarefas propostas para a avaliação de memória relacionada à orientação espacial. Os resultados obtidos dos padrões comportamentais se assemelham bastante aos efeitos que se observam em experimentos cujos objetivos visavam lesão do tecido hipocampal em ratos (Xavier *et al.*, 2009). Os resultados demonstraram claramente que a injeção icv de STZ prejudicou a aquisição de memória de navegação espacial de referência no teste do labirinto aquático. Podemos perceber que ao analisarmos o comprimento do trajeto e o tempo gasto no anel B, que os animais do grupo STZ não melhoraram como os controles na tarefa de aquisição. Apesar disso, os animais STZ apresentaram uma diminuição de latência e aumento do tempo no quadrante crítico com o passar do tempo, o que demonstra também que apesar de menos pronunciadas, os animais experimentais exibiram melhoras com o passar da repetição dos treinos. Esses resultados mostram que os ratos STZ demoraram mais para encontrar a plataforma do que os controles, e que também exibiram uma estratégia de procura espacial imprecisa, o que se nota pela constância no comprimento do trajeto e tempo no anel B. Embora os animais do grupo STZ tenham apresentado claramente uma disfunção na aquisição de informação sobre a localização precisa da plataforma, as melhoras com relação à latência e porcentagem de tempo no quadrante crítico sugerem que eles adquiriram informação sobre a presença da plataforma na piscina, além de terem obtido uma idéia geral de onde encontrá-la. No entanto, uma vez na região da plataforma, os animais STZ não sabiam onde procurar com precisão.

Já nos teste de memória operacional podemos observar que os ratos STZ não apresentam uma melhora na execução da tarefa quando se compara a primeira tentativa com as tentativas seguintes. Além disso, pode-se afirmar que os ratos controle e os ratos STZ são igualmente aptos a encontrar a plataforma na primeira tentativa de cada dia, o que sugere que a informação que guia os procedimentos necessários para execução da tarefa no labirinto aquático baseia-se inteiramente na memória. De forma diferente dos animais controle, os

ratos STZ não se beneficiam da informação adquirida na primeira tentativa sobre a localização específica da plataforma. O desempenho dos ratos STZ e controle na primeira tentativa, ambos em termos de latência e comprimento de trajeto, não diferiram de forma significativa. Esse resultado demonstra que os animais controle, quando não sabem a localização da plataforma, apresentam desempenho igual aos animais STZ, mostrando que, o que diferencia o desempenho dos dois grupos é a aquisição e retenção de informação relevante sobre a localização da plataforma. Os ratos lesionados podem manter alguma informação por um curto período de tempo, enquanto desempenham a procura, mas a descontinuidade representada por encontrarem a plataforma e/ou serem removidos da piscina para aguardarem a segunda tentativa faz com que eles percam informação crítica a respeito da localização da plataforma. De fato, quando comparamos os resultados do teste de memória operacional com IET igual a 10 com os resultados do teste com IET igual a 0, podemos claramente perceber que a memória operacional dos ratos STZ foi prejudicada somente quando o intervalo entre a tentativa inicial (tentativa da qual o animal deveria reter informações a respeito da nova localização da plataforma) e as tentativas seguintes foi de 10 minutos. Quando o intervalo foi virtualmente igual a zero, os ratos STZ apresentaram uma melhora significativa representada pela diminuição marcante na latência e comprimento do trajeto. Esse fato sugere que os animais lesionados apresentam algum tipo de aquisição de informação, enquanto seus mecanismos de retenção estão altamente comprometidos.

É importante ressaltar que através do teste de avaliação, podemos descartar a possibilidade de que os grupos STZ e controle diferem em outras eventuais características que poderiam interferir na execução da tarefa, como por exemplo, a falta do conhecimento da existência de uma plataforma, o controle motor adequado para nadar e/ou a motivação.

Uma outra questão importante é que a maioria dos trabalhos que utilizam o modelo de STZ icv, se utiliza de testes comportamentais, principalmente aqueles que avaliam prejuízos de memória, apenas com o intuito de validar o modelo experimental e correlaciona-lo com a DA em humanos. (Grunblatt *et al.*, 2007; Hoyer & Lannert, 2008; Lannert *et al.*, 1998; Sharma & Gupta, 2002). Nosso trabalho, no entanto, avaliou uma série de parâmetros relacionados ao processamento cognitivo que envolve aprendizado e memória, demonstrando, por

exemplo, que há prejuízos em períodos bem precoces após a injeção da droga. Além disso, nós observamos que apesar dos animais STZ apresentarem prejuízos na retenção da memória, como dito anteriormente, eles ainda eram capazes de adquirir novas informações.

Com a progressão da doença são observadas alterações de diversos sistemas de neurotransmissão, provável consequência da morte neuronal progressiva. Desses, o mais severamente afetado parece ser o sistema colinérgico (Hoogendijk *et al.*, 1999). O sistema colinérgico é responsável pelo armazenamento e recuperação da memória e seu declínio se correlaciona bem com a gravidade do comprometimento cognitivo e de memória. A perda da inervação colinérgica, demonstrada pela redução da ChAT é bem correlacionada com o grau da gravidade da doença e é uma marca neuropatológica da DA (Klucken *et al.*, 2003; Ingelsson *et al.*, 2004). Além disso, a redução do metabolismo energético culmina com a diminuição da síntese de acetil CoA, que tem como resultado a deficiência da síntese de acetilcolina, e talvez isso explique o declínio de memória em ratos injetados icv com STZ. Apesar do comprometimento no sistema colinérgico ser bastante enfatizado, nossos resultados demonstraram uma acentuada diminuição na expressão da ChAT apenas na amígdala e não em estruturas diretamente envolvidas no processamento da memória. Esses resultados podem significar, talvez, que seja necessário um período após a injeção de STZ maior para que possamos observar uma diminuição nas áreas relacionadas diretamente com a memória, como no hipocampo. Além da disfunção da sinalização dos receptores de insulina, a injeção de STZ nos ratos poderia causar prejuízos diretos no sistema colinérgico, como vários trabalhos têm demonstrado. Por exemplo, Blokland e Jolles (1993) observaram uma declínio da atividade da enzima ChAT, bem como uma diminuição de sua expressão no sistema septo-hipocampal no modelo de DA induzida por STZ. Outros trabalhos ainda mostraram uma redução de 40% do peso do septo (Terwel *et al.*, 1995), diminuição no transporte do fator de crescimento neural (NGF) do hipocampo para o septo (Hellweg *et al.*, 1992), ativação da microglia e danos específicos em tratos mielinizados do fórnix através de geração de estresse oxidativo, perturbando assim, conexões septo-hipocampal (Shoham *et al.*, 2003). Todos esses mecanismos patológicos parecem desempenhar um papel no desenvolvimento no envelhecimento e na DA.

Na maioria dos trabalhos que usam modelos *in vivo* utilizados para a indução da DA, como modelos de animais transgênicos ou modelos com a aplicação icv da STZ, é rara a descrição simultânea de um aumento da β A ou sua agregação e da hiperfosforilação da tau. De fato, as similaridades entre a DAE em humanos e os modelos animais têm sido descritas nos níveis comportamental e molecular. Especialmente no modelo de aplicação icv de STZ, nenhum trabalho demonstrou completamente as características histológicas. Esse fato se mostrava preocupante no uso do modelo para entender os mecanismos da doença em humanos. Nosso trabalho demonstrou, no entanto, um aumento significativo da expressão da β A no hipotálamo, amígdala, córtex entorrinal e nos núcleos da base. A outra grande marca da DA, a hiperfosforilação da proteína tau, foi apenas demonstrada em um estudo utilizando tratamento com STZ em filhotes de ratos, onde se observou a hiperfosforilação da proteína (Lester-Coll *et al.*, 2006). Além deste estudo, Grünblatt e colaboradores (2007) mostraram que a injeção icv de STZ em baixas doses acarreta em um aumento do conteúdo total e da versão fosforilada dessa proteína no hipocampo. No entanto, este trabalho não foi capaz de definir esse aumento como hiperfosforilação, uma vez que para isso é necessário se fazer uma razão entre tau fosforilada/tau total. Nós, por outro lado, após a análise dessa razão, observamos haver uma hiperfosforilação da proteína neste modelo, no córtex entorrinal, amígdala, cerebelo, córtex, prosencéfalo basal e nos núcleos da base, apesar de não observar essa hiperfosforilação no hipocampo.

Os resultados sobre a expressão da GFAP indicam que pode haver um leve processo inflamatório especialmente no córtex e nos núcleos da base. O aumento da GFAP está associado com reações inflamatórias e oxidativas e, de forma indireta, com neurodegeneração. Estudos mostram que, na DA, é comum uma resposta glial exacerbada, e especialmente um aumento na ativação de astrócitos e microglias nas proximidades das placas (Hoyer, 2003).

Em resumo, os resultados sugerem claramente que a injeção icv de STZ em ratos acarreta em algum tipo de processo degenerativo com curso temporal distinto, demonstrada pelos déficits de memória e por alterações moleculares de curto e longo prazo. Problemas de aquisição, retenção e resgate de memória, bem como um prejuízo na memória operacional são característicos de animais cujo hipocampo foi lesionado (Xavier *et al.*, 1999), mas a progressão do processo

degenerativo parece envolver regiões direta ou indiretamente relacionadas a essa estrutura. De modo geral, podemos dizer que esse parece ser um modelo experimental de neurodegeneração e talvez da DA, e pode contribuir para o entendimento dessa e de outras patologias degenerativas, bem como servir de base para futuras intervenções terapêuticas.

6. Conclusões

- A injeção intracerebroventricular de STZ em ratos se mostrou um modelo experimental bastante fiel às características comportamentais e moleculares observadas em pacientes com a Doença de Alzheimer, no que diz respeito aos prejuízos relacionados à memória (aquisição e principalmente retenção) e aumento do peptídeo β A e hiperfosforilação da proteína tau.
- Com os presentes dados experimentais não é possível dizer se a degeneração dos neurônios ocorre por ação direta da droga ou se a mesma provoca o desencadeamento de processos mais complexos que culminam na morte desses neurônios.
- A injeção icv de estreptozotocina acarreta morte de neurônios hipocampais, do hipotálamo e da área septal, sendo que esta ainda não havia sido descrita, com alterações moleculares características da doença.

7. Referências

- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., and Ikeda, K.. Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **14 Suppl 1**, S47-53, 2000^a.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrazek, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., and Wyss-Coray, T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **21**, 383-421, 2000b.
- alkire, m.t.; haier, r.j.; fallon, j.h.; cahill, l. Hippocampal, but not amygdala, activity at encoding correlates with long-term, free recall of non emotional information. *Proc Natl Sci*, **95**, 14506-14516, 1998.
- Arulison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C., Penicaud L. Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain—an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. **28**, 117–136, 2004.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., and Hyman, B. T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**, 631-9, 1992.
- arulmozhi, d.k; veeranjanyulu a.; bodhankar, s.l. Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus : A glance. *Indian Journal of Pharmacology*, **36**, 217-221, 2004.
- 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* **33**, 1041-4, 2005.

- Birnbaum, M.J. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell*, **57**: 305-315, 1989.
- Braak, H. & Braak, E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* **18**, 351-7, 1997.
- Bussiere, T., Giannakopoulos, P., Bouras, C., Perl, D. P., Morrison, J. H., and Hof, P. R. Progressive degeneration of nonphosphorylated neurofilament protein-enriched pyramidal neurons predicts cognitive impairment in Alzheimer's disease: stereologic analysis of prefrontal cortex area 9. *J Comp Neurol* **463**, 281-302, 2003.
- 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* **7**, 45–61, 2005.
- de la Monte, S.M, Tong, M, Lester-Coll, N, Plater, M. Jr, Wands, J.R. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* **10**: 89–109, 2006.
- Dekosky, S. T. & Scheff, S. W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* **27**, 457-64, 1990.
- Dineley, K. T., Westerman, M., Bui, D., Bell, K., Ashe, K. H., and Sweatt, J. D. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* **21**, 4125-33, 2001.
- Doré, S., KAR, S., Rowe, W., Quirion, R. Distribution and levels of [125I]IGF-I, [125I] IGF-II and [125I]Insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-unimpaired and -impaired rats. *Neuroscience*, **80**: 1033–1040, 1997.

Dougherty, J.J., Wu, J., & Nichols, R. A. Beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex. *J Neurosci* **23**, 6740-7, 2003.

Forlenza, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. *Rev. Psiq. Clín.* **32**, 137-148, 2005.

Frautschy, S. A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T. C., Hsiao, K., and Cole, G. M. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* **152**, 307-17, 1998.

Gasparini, L., Netzer, W. J., Greengard, P., and Xu, H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci* **23**, 288-93, 2002.

Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G., and Hof, P. R. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* **60**, 1495-500, 2003.

Grünblatt 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* **3**:757–770, 2007.

Grünblatt E., Hoyer, S., Riederer. P. Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transmission*, **111**: 367-386, 2004.

http://www.searo.who.int/en/section1174/section1199/section1567_6740.htm.

Consultado em 03/2010

Heide, L. P., et al. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. *Progress in Neurobiology*, **79**, 205–221, 2006.

- 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* **21**, 63-74, 1995.
- Hof, P. R., Vogt, B. A., Bouras, C., and Morrison, J. H. Atypical form of Alzheimer's disease with prominent posterior cortical atrophy: a review of lesion distribution and circuit disconnection in cortical visual pathways. *Vision Res* **37**, 3609-25, 1997.
- Hoogendijk, W. J., Feenstra, M. G., Botterblom, M. H., Gilhuis, J., Sommer, I. E., Kamphorst, W., Eikelenboom, P., and Swaab, D. F. Increased activity of surviving locus ceruleus neurons in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **45**, 82-91, 1999.
- Hoyer, S.. The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. *J Neural Transm* **109**, 341-60, 2002.
- Hoyer, S. Memory function and brain glucose metabolism. *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 1**, S62-7, 2003.
- 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* **111**, 575-89, 2004.
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Kromer, L. J., and Damasio, A. R. Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **20**, 472-81, 1986
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K. L., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Frosch, M. P., Albert, M. S., Hyman, B. T., and Irizarry, M. C. Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* **62**, 925-31, 2004.

- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T., and Imahori, K. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* **325**, 167-72, 1993.
- Jantzen, P. T., Connor, K. E., DiCarlo, G., Wenk, G. L., Wallace, J. L., Rojiani, A. M., Coppola, D., Morgan, D., and Gordon, M. N. Microglial activation and beta -amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice. *J Neurosci* **22**, 2246-54, 2002.
- Johnston, A. M., Pirola, L., & Van Obberghen, E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Lett* **546**, 32-6, 2003.
- Kadowaki, T., Kasaga, M., Akamuma, Y., Ezaki, O., Takaku, F. Decreased autophosphorylation of the insulin receptor-kinase in streptozotocin diabetic rats. *J Biol Chem* **259**, 14208-14216, 1984.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B.. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-6, 1987.
- Kar, S., Slowikowski, S. P., Westaway, D., and Mount, H. T. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* **29**, 427-41, 2004.
- Kilpatrick, L. & Cahill, L. Amygdala modulation of parahippocampal and frontal regions during emotionally influenced memory storage. *Neuroimage*, **20**, 2091-2099, 2003
- Klucken, J., McLean, P. J., Gomez-Tortosa, E., Ingelsson, M., and Hyman, B. T.. Neuritic alterations and neural system dysfunction in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurochem Res* **28**, 1683-91, 2003.

- Lester-Coll, N., Rivera, E. J., Soscia, S.J., Doiron, Kathryn, Wands, J.R. & de la Monte S. M. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: Relevance to sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. **9** 13–33, 2006.
- Leloup, C., et al.,. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Research*. **638**, 221-226, 1994.
- Li, L. & Hölscher, C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain Res Rev*. **56(2)**, 384–402, 2007.
- Liu, Q., Kawai, H., and Berg, D. K. beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4734-4739, 2001.
- Maher, F., Vanucci, S.J., Simpson, I.A. Glucose transporter isoforms in brain: absence of GLUT 3 from the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, **13**: 342-345, 1993
- Masliahe, E., Sisk, A., Mallory, M., Mucke, L., Schenk, D., and Games, D. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16**, 5795-811, 1996.
- Meng, T. C., et al., Regulation of Insulin Signaling through Reversible Oxidation of the Protein-tyrosine Phosphatases TC45 and PTP1B. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 37716–37725
- Messier, C. Glucose improvement of memory: a review. *Eur J Pharmacol*, **490**: 33-57, 2004.
- Morrison, J. H. & Hof, P. R. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* **278**, 412-419, 1997.

- Nagamatsu, S., Kornhauser, J.M., Burant, C.F., Seino, S., Mayo, K.E., Bell, G.I. Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT 3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem*, **267**: 467-472, 1993.
- Paxinos, G. & Watson, C. "The rat brain in stereotaxic coordinates.," *Academic Press, San Diego*, 2005.
- Pettit, D. L., Shao, Z., and Yakel, J. L. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* **21**, 120, 2001.
- Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M., and Klein, P. S. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* **423**, 435-9, 2003.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., and Govoni, S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol Res* **50**, 441-51, 2004.
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M. E., Jaggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Holscher, C., Mathews, P. M., and Jucker, M. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* **7**, 940-6, 2006.
- Rayner, D.V.; Glucose Transporters in the brain. *Proc. Nutr. Soc*, **55**: 209-219, 1996.
- Reagan, L.P., Gorovits, N., Hoskin, E.K., Alves, S.E., Katz, E.B., Grillo, C.A., Piroli, G.G., McEwen, B.S., Charron, M.J. Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**: 2820-2825, 2001.

- Reagan, L.P., Rossel, D.R., Alves, S.E., Hoskin, E.K., McCall, A.L., Charron, M.J., Mcewen, B.S. GLUT8 glucose transporter is localized to excitatory and inhibitory neurons in the rat hippocampus. *Brain Res*, **932**, 129-134, 2002
- Rogers, J., & Lue, L. F. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* . **39**, 333-40, 2001.
- Salkovic-Petrisic M, Hoyer S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. *J Neural Transm Suppl* **72**, 217– 233, 2007.
- Salkovic-Petrisic, M., Tribl, F., Schmidt, M., Hoyer, S., and 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* **96**, 1005-15, 2006.
- Shoham S, Bejar C, Kovalev E, Weinstock M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol* 184: 1043–1052, 2003.
- Spires, T. L., & Hyman, B. T. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx* **2**, 423-37, 2005.
- Swartz, B.E., Halgren, E., Fuster, J.M., Simpkins, E., Gee, M., Mandelkern, M. Cortical metabolic activation in humans during a visual memory task. *Cereb Cortex*, **5**: 205-214, 1995.
- Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res* **50**, 537-46, 2001.

- Takada, J. Neonatal streptozotocin-induces diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *metabolism clinical and experimental*, **56**, 997-984, 2007.
- Talley, C.P., Clayborn H., Jewel E., Mccarty, R., Gold, P.E. Vagotomy attenuates effects of L-glucose but not of D- glucose on spontaneous alternation performance. *Physiol. and Beh*, **77**, 243-249, 2002.
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., and Katzman, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**, 572-80, 1991.
- Vanucci, S.J., Maher, F., Simpson, I.A. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*, **21**, 2-21, 1997.
- Vanucci, S.J., Clark, R.R., Koehler-Stec, E., Li, K., Smith, C.B., Davies, P., Maher, F., Simpson, I.A. (1998) Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev Neurosci*, **20**, 369-379.
- Wang, H. Y., Lee, D. H., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P., and Reitz, A. B. (2000). β -Amyloid(1-42) binds to α 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* **275**, 5626-32.
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., and Troncoso, J. C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* **344**, 769-72, 1994.
- Wilson, G. L. & Leiter, E. H. Streptozotocin interactions with pancreatic β cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microb Immunol* **156**, 27-33, 1990.

- Xavier, G. F., Dentate Gyrus-Selective Colchicine Lesion and Disruption of Performance in Spatial Tasks: Difficulties in “Place Strategy” Because of a Lack of Flexibility in the Use of Environmental Cues?. *Hippocampus* **9**, 668-681, 1999.
- Xavier, G. F., & Costa, V. C. I. Dentate Gyrus and Spatial Behaviour. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **33**, 762–773, 2009.
- Yamamoto, S, Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1772**, 958–967, 2007.
- Zubenko, G. S., Moosy, J., Martinez, A. J., Rao, G., Claassen, D., Rosen, J., and Kopp, U. Neuropathologic and neurochemical correlates of psychosis in primary dementia. *Arch Neurol* **48**, 619-24, 1991.