## JEFERSON RUBENS MAMONA DA SILVA

Avaliação dos efeitos do tratamento prolongado com geleia real na cognição de ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica

> Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo 2021

## JEFERSON RUBENS MAMONA DA SILVA

# Avaliação dos efeitos do tratamento prolongado com geleia real na cognição de ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Renato Mancini Astray

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD). CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

## Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor (a)

Silva, Jeferson Avaliação dos efeitos do tratamento prolongado com geleia real na cognição de ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica / Jeferson Silva; orientador Renato Astray. -- São Paulo, 2021. 121 p. Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Cognição. 2. Doença de Alzheimer. 3. Estreptozotocina. 4. Geleia Real. 5. Neuroproteção. I. Astray, Renato, orientador. II. Título.

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): JEFERSON RUBENS MAMONA DA SILVA

Título da Dissertação: Avaliação dos efeitos do tratamento prolongado com geleia real na cognição de ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica

Orientador: Prof. Dr. Renato Mancini Astray

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a ..................., considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

ib butantan

# *Comissão de Ética no Uso de Animais*

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos do tratamento prolongado com geleia real na cognição de ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica", protocolada sob o CEUA nº 1246250718 (ID 001831), sob a responsabilidade de **Maria Regina Lopes Sandoval** e equipe; Renato Mancini Astray; Jeferson Rubens Mamona da Silva; Fernando Maurício Abdalla - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 18/09/2019.

We certify that the proposal "Effects of Royal Jelly long-term treatment on cognition of Wistar rats submitted to intracerebroventricular administration of streptozotocin, a model of sporadic Alzheimer's disease", utilizing 72 Heterogenics rats (72 males), protocol number CEUA 1246250718 (ID 001831), under the responsibility of **Maria Regina Lopes Sandoval** and team; Renato Mancini Astray; Jeferson Rubens Mamona da Silva; Fernando Maurício Abdalla - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 09/18/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2018 a 12/2021

Origem:	Biotério Central					
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade:	70 a 90 dias	N:	72
Linhagem:	Wistar		Peso:	220 a 270 g		

Área: Farmacologia

Local do experimento: Laboratorio de Farmacologia do Instituto Butantan. Sala de experimentação comportamental com controle de temperatura e isolamento acustico Sala de procedimentos de dessecção de estruras cerebrais para processamento dos cérebros

Attaine Leonor Jaino de Oliveire

Maria Leonor Sarno de Oliveira Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto Butantan

São Paulo, 01 de abril de 2020

Nancy Oguiura Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto Butantan

Dedico esse trabalho aos meus pais. A infraestrutura que permitiu minha formação.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Elaine Mamona e Rubem Oliveira, pelos ensinamentos e apoio, por acreditar e me apoiar sempre. Cada palavra escrita nesse trabalho foi possível graças a vocês.

À minha namorada e companheira Vivian Souza, por estar comigo na guerra me apoiando com seu amor. Sinto uma alegria e satisfação imensa em dividir esse momento da minha vida com você.

À minha família, em especial, minhas avós Gudite e Norma, às minhas tias: Laís, Cleuza, Juliana, Marisa, Valdirene e Neusa, pelo amor, apoio e ensinamentos. Ao meu tio Renato *(In memoriam)*, por me apresentar a filosofia e o pensamento crítico. À minha prima Rebeca pela inspiração.

À Dra. Maria Regina Lopes Sandoval, minha orientadora, quero agradecer pela oportunidade e confiança que recebi no início da minha trajetória acadêmica ao estagiar no laboratório de farmacologia do Instituto Butantan. Foi a partir desse momento que pude obter as condições materiais necessárias para evoluir como indivíduo e entender de fato o que é ciência. Obrigado pelos ensinamentos e pela orientação.

Ao Dr. Renato Mancini Astray pela confiança, colaboração e apoio ao projeto.

Ao Dr. Tiago Guardia de Souza e Silva, pela colaboração, amizade, ensinamentos, sugestões e conselhos.

Ao Dr. Fernando Maurício Francis Abdalla, pela colaboração, importante orientação, ensinamentos e tempo despendido para esclarecer dúvidas.

À Dra. Solange Castro Afeche, pelo acolhimento, colaboração, ensinamentos e esclarecimento de dúvidas.

Ao Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto, pela colaboração, pelos ensinamentos e por permitir o livre acesso ao laboratório para a realização das análises histológicas.

À Maria Eliza, pelas metologias passadas, pelo auxílio nos vários experimentos, paciência e parceria.

Ao Me. Marcelo Florencio, pela parceria, apoio nos experimentos e por compartilhar conhecimentos e experiências ao longo desses anos.

Aos membros da equipe de funcionários do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, pelo apoio e pelos aprendizados experienciados. Em especial agradeço ao José Aparecido pelo grande apoio nos experimentos, ao Paulo Henrique, Maria Eliene, Sr. Antônio *(In memoriam)*, etc.

Ao corpo de pesquisadores do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan que por muitas vezes me ajudaram sanando dúvidas que surgiam pelo caminho.

Aos alunos do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan e de outros laboratórios do Instituto, pela ajuda nos experimentos, pelas discussões, companhia e pelo apoio que me foi dado das mais diferentes formas; Usama Anwer, Saulo, Christian, Rodrigo, Patrícia, Natália, Lucas, Roberta, Élbio, Janaína, Vitor, Vanessa e todos os demais.

Aos funcionários, colaboradores e estudantes do Laboratório de Neurobiologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo apoio, aprendizado e pelas experiências vividas. Em especial, agradeço ao Adilson da Silva, pelos ensinamentos, companhia, humor ácido e por alegrar o laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e a Universidade de São Paulo pelo auxílio e apoio técnico ao projeto.

À Fundação Butantan pelo auxílio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

"De tudo quanto se escreve, agrada-me apenas o que alguém escreve com o próprio sangue. Escreve com sangue e aprenderás que sangue é espírito."

(NIETZSCHE, 2012, p. 45)

### RESUMO

SILVA, JRM. Avaliação dos efeitos do tratamento prolongado com geleia real na cognição de ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica. 2021. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Introdução: A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa progressiva e fatal que induz deterioração cognitiva e da memória. A injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (icv-STZ) demonstrou ser um modelo experimental da doença de Alzheimer esporádica em roedores, reproduzindo muitas das características comportamentais e moleculares dessa doença. A geleia real (GR) é uma substância secretada pelas glândulas hipofaríngeanas e mandibulares de abelhas operárias da espécie Apis mellifera. Objetivo: Investigar os efeitos do consumo oral da GR em ratos submetidos ao modelo icv-STZ na aprendizagem e na memória pelo teste do labirinto aquático de Morris (MWM), teste do Reconhecimento de Objetos (RO), atividade geral em Campo Aberto, análises histológicas caracterizando a atividade de células gliais e ensaios de imunoprecipitação com foco na expressão de subtipos de receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs) (M1-M<sub>5</sub>) no hipocampo de ratos. **Métodos:** Ratos Wistar machos adultos foram divididos em quatro grupos (CTR, STZ, GR, STZ-GR). A administração bilateral de estreptozotocina (STZ) (3 mg/kg) ou solução Ringer foi realizada por estereotaxia. Após 7 dias da cirurgia, os animais receberam diariamente GR (200 mg/kg) ou solução controle por gavagem por 14 dias consecutivos. O teste do labirinto aguático de Morris foi realizado antes (P1), após (P2) a injeção de icv-STZ, e durante a administração da GR (P3). O teste RO foi realizado no 14º dia após a cirurgia icv-STZ. O teste de Campo Aberto foi realizado no 13º dia após a cirurgia icv-STZ. No 21º dia os animais foram sacrificados e a análise da glia reativa no hipocampo foi feita, assim como a expressão de cada subtipo de receptor muscarínico por ensaios de imunoprecipitação com anticorpo que reconhece cada um dos subtipos de mAChRs. Resultados e Conclusão: No Período P2: icv-STZ induziu um aumento na latência, distância percorrida e uma diminuição na % Tempo no contador. No período P3, o consumo prolongado da GR melhorou o aprendizado espacial dos animais do grupo icv-STZ, conforme observado pela redução da latência em T2, T3 e T4. Teste RO: Os ratos

tratados com STZ passaram menos tempo explorando o novo objeto do que o objeto familiar quando comparados aos grupos CTR e GR, após um período de 1 hora e 24 horas. Atividade Geral em Campo Aberto: a injeção icv-STZ e o tratamento prolongado com GR não causaram qualquer alteração nos parâmetros investigados. O tratamento com GR produziu uma redução da astrogliose induzida por STZ nas regiões CA1, CA3, GD e HL do hipocampo de ratos. Os sujeitos tratados com STZ (grupo STZ) apresentaram uma diminuição da expressão do subtipo M<sub>1</sub> e o tratamento com GR (grupo STZ-GR) recuperou a expressão. Entretanto, os subtipos M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> não diferiram entre os grupos. Nossos resultados mostram que a injeção icv-STZ causou um prejuízo cognitivo, induziu um aumento da expressão de células gliais hipocampais e uma redução da expressão do subtipo de mAChRs M<sub>1</sub>. Por outro lado, o tratamento prolongado com a GR reverteu parcialmente os prejuízos cognitivos, reduziu a densidade de células gliais e recuperou a expressão do receptor M1 comparativamente ao grupo STZ. Esses resultados sugerem que a geleia real melhora o déficit cognitivo no modelo de DAE induzida por STZ em ratos, atenuando a neuroinflamação, diminuindo a ativação de astrócitos e normalizando a expressão de M1AChR no hipocampo.

**Palavras-chave**: Cognição. Doença de Alzheimer. Estreptozotocina. Geleia Real. Glia Reativa. Receptores muscarínicos. Neuroproteção.

## ABSTRACT

SILVA, JRM. Evaluation of the royal jelly long-term effects on cognition in icv-STZ injected rats, a model of sporadic Alzheimer's disease. 2021. 121 p. Masters thesis (Biotecnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

**Introduction:** Alzheimer's disease (AD) is a progressive and fatal neurodegenerative disorder that induces cognitive and memory deterioration. Intracerebroventricular injection of streptozotocin (icv-STZ) has been shown to be an experimental model of sporadic Alzheimer's disease in rodents, reproducing many of the behavioral and molecular characteristics of this disease. Royal jelly (RJ) is a substance secreted by the hypopharyngeal and mandibular glands of worker bees of the species Apis mellifera. Objective: To investigate the effects of oral consumption of RJ on rats submitted to the icv-STZ model on learning and memory by the Morris Water Maze Test (MWM), object recognition (OR) test, general activity in open field test, and characterizing the activity histological analyzes of Glial cells besides immunoprecipitation assays focusing on Expression of each muscarinic acethylcholine receptor (mAChRs) subtypes (M1 to M5) in rat hippocampus. Methods: Adult male Wistar rats were divided into four groups (CTR, STZ, CTR-RJ, STZ-RJ). Stereotaxic surgery for bilateral icv administration of streptozotocin (STZ) (3 mg/kg) or control solution was performed. The animals received daily RJ (200 mg/kg) or control solution by gavage for 14 consecutive days. The MWM Task was performed before (P1), after (P2) the ICV-STZ injection, and during the RJ administration for eleven days (P3). The OR test was performed in the 14th day after icv-STZ surgery. The Open Field test was performed in the 13th day after the icv-STZ surgery. In the 21° day after surgery the animals were euthanized and the reactive glia in the hippocampus was analyzed, as well as expression of each mAChR subtype (M1 to M5) by immunoprecipitation assays. **Results and Conclusion**: Period P2: icv-STZ induced an increase in the latency to find the platform, distance (path length) and a decrease in the percentage of time spent within the critical counter, indicating a work memory disruption. In the P3 period, longterm consumption of RJ improved spatial learning rate was improved as observed by the reduction of latency in T2, T3 and T4. RO test: STZ-treated rats spent less time exploring the new object than the familiar object when compared to the CTR and CTR-GR groups, after 1 and 24 hours indicating that the STZ induced an impairment shortterm memory and long-term memory and that the RJ did not revert this effect. Open Field: the icv-STZ injection and the prolonged treatment with GR did not cause any change in the parameters analysed. The long-term oral treatment with RJ induced significant effects reducing astrogliosis STZ-induced in the rat hippocampal CA3, GD, HL and CA1 regions. The animals injected with icv-STZ (STZ group) showed a decrease in the expression of M<sub>1</sub> subtype and the long-term oral treatment with RJ (STZ-RJ) recovered the expression. However, the M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> and M<sub>5</sub> subtypes did not differ among the groups. Our results show that the icv-STZ injection was able to cause cognitive impairment, induce increased expression of hippocampal Glial cells and induced a decrease in the expression of M<sub>1</sub> mAChR subtype. In addition, prolonged treatment with GR was able to partially reverse cognitive impairments, reduce the density of glial cells and recovered the expression of M<sub>1</sub> mAChR compared to STZ group. These results suggest that royal jelly improves the cognitive deficit in the STZ-induced rat model of sporadic AD by attenuating neuroinflammation, decreasing astrocytes activation, and normalizing the hippocampal M1AChR expression.

**Keywords:** Cognition. Alzheimer's disease. Streptozotocin. Royal jelly. Reactive Glia. Muscarinic Receptors. Neuroprotection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema simplificado da conectividade entre estruturas na região

Figura 4 – Esquema representativo do teste de labirinto aquático de Morris; Morris water maze (MWM)......46 Figura 6 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das tentativas no teste Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1......58 Figura 7 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2......60 Figura 8 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3. .....62 Figura 9 – Efeitos da injeção icv-STZ e do tratamento prolongado com Geleia Real sobre a atividade exploratória dos animais observados em Campo Aberto ......64 Figura 10 – Avaliação da memória de curto e longo prazo dos animais, utilizando o teste de Reconhecimento de Objetos, 1 hora e 24 horas após a fase de amostragem Figura 11 – Fotomicrografias digitais representativas de cortes coronais do

**Figura 19** – Porcentagem de imunoprecipitação dos receptores M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub>......82

Figura 20 – Expressão do receptor muscarínico M<sub>1</sub>, em hipocampo de ratos.......83

Figura 21 – Expressão do receptor muscarínico M<sub>2</sub>, em hipocampo de ratos.......84

Figura 22 – Expressão do receptor muscarínico M<sub>3</sub>, em hipocampo de ratos.......85

Figura 23 – Expressão do receptor muscarínico M<sub>4</sub>, em hipocampo de ratos.......86

Figura 24 – Expressão do receptor muscarínico M<sub>5</sub>, em hipocampo de rato .......87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados do teste de memória operacional espacial feito no perío	do P1 57
<b>Tabela 2 –</b> Resultados do teste de memória operacional espacial feito no prerío (4° e 6° dias)	do P2 59
<b>Tabela 3</b> – Resultados do teste de memória operacional espacial feito no Pe P3	eríodo

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- %T-A\_CONT Porcentagem de Tempo na Área do Contador
- 10-HDA ácido 10-hidroxi-2-decenóico
- ([<sup>3</sup>H]NMS) [<sup>3</sup>H]N-Metil-Escopolamina
- ([<sup>3</sup>H]QNB) [<sup>3</sup>H]Quinuclidynil benzilate
- ACh Acetilcolina
- AChE Acetilcolinesterase
- ADI Alzheimer's Disease International
- Akt Proteína Quinase B
- AMP Monofosfato de adenosina
- APP Proteína Precursora Amiloide
- ATP Adenosina trifosfato
- Aβ Peptídeo beta amilóide
- DA Doença de Alzheimer
- DAE Doença de Alzheimer do tipo esporádica
- DAF Doença de Alzheimer do tipo Familial
- BBB Barreira hematoencefálica
- BuChE Butirilcolinesterase
- CA Corno de Ammon
- CA Teste de Campo Aberto
- ChAT Colina-O-acetiltransferase
- DAB Diaminobenzidina
- DAG Diacilglicerol
- DIST Distância Percorrida
- DM Diabetes mellitus
- EC Córtex entorrinal
- EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-Ácetico
- EROs Espécies reativas de oxigênio
- GD Giro Denteado
- GFAP Proteína glial fibrilar ácida
- GLUT 1, 2, 3 Transportadores de glicose
- GR Geleia Real
- GSK3 Glicogênio Sintase Quinase 3

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de Hidrogênio
- HL Hilo
- IBA-1 Molécula Adaptadora ligante de Cálcio Ionizado
- icv intracerebroventricular
- IET Intervalo de tempo entre as tentativas
- IGF Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
- i.p Intraperitoneal
- IP<sub>3</sub>-Inositol 1,4,5-trifosfato
- IR Receptor de insulina
- LAT Latência para Encontrar a Plataforma
- LPS Modelo indutor de inflamação com Lipopolissacarídeo
- M1 Receptor muscarínico do subtipo M1
- M2 Receptor muscarínico do subtipo M2
- M<sub>3</sub> Receptor muscarínico do subtipo M<sub>3</sub>
- M4 Receptor muscarínico do subtipo M4
- M<sub>5</sub> Receptor muscarínico do subtipo M<sub>5</sub>
- mAChRs Receptores muscarínicos de acetilcolina
- MgCl<sub>2</sub> Cloreto de Magnésio
- MRJP Major Royal Jelly Proteins
- NSC's Células-tronco ou progenitoras neurais
- OMS Organização Mundial da Saúde
- PBS Tampão fosfato
- PMFS Fluoreto de fenilmetilsulfonil
- Proteínas G Proteínas heterotriméricas, ligadas ao nucleotídeo de guanina
- PTMs Modificações pós-traducionais
- SNC Sistema Nervoso Central
- SNP Sistema nervoso periférico
- SUB Subículo
- STZ estreptozotocina
- Tau Proteína Tau
- TCE Lesão cerebral traumática
- Tris-HCI Hidrocloreto de Tris (solução tampão)
- VAChT Transportador vesicular de acetilcolina

## SUMÁRIO

1 II	NTRODUÇÃO	.22
1.1	Doença de Alzheimer	.22
1.2	Modelo Animal da DAE Induzido por Estreptozotocina	.23
1.3	Ніросатро	.28
1.4	Papel dos Astrócitos e da Micróglia na Neuroinflamação	.29
1.5	Sistema Colinérgico e os Receptores Colinérgicos Muscarínicos	.30
1.6	Receptores Colinérgicos Muscarínicos no Sistema Nervoso Central	.32
1.7	Receptores Colinérgicos Muscarínicos na DA	.34
1.8	Geleia Real	.37
2 C	DBJETIVO GERAL	.42
2.1	Objetivos Específicos	.42
3 N	IATERIAIS E MÉTODOS	.43
3.1	Animais	.43
3.2	Geleia Real	.43
3.3	Administração icv de Estreptozotocina; Modelo Experimental da Doença	de
Alzl	heimer Esporádica	.43
3.4	Grupos Experimentais	44
	Crupeo Experimentale	• • •
3.5	Testes comportamentais	.44
<b>3.5</b> 3.5.	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris	.44 .44
<b>3.5</b> 3.5. 3.5.	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)	.44 .44 .46
<b>3.5</b> 3.5. 3.5. 3.5.	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)         3 Reconhecimento de Objetos (RO)	.44 .44 .46 .47
<b>3.5</b> 3.5. 3.5. 3.5. <b>3.6</b>	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)         3 Reconhecimento de Objetos (RO)         Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de	.44 .44 .46 .47
3.5. 3.5. 3.5. 3.5. <b>3.6</b> rate	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)         3 Reconhecimento de Objetos (RO)         Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de	.44 .44 .46 .47 .48
3.5. 3.5. 3.5. 3.5. <b>3.6</b> rato 3.7	Testes comportamentais 1 Labirinto Aquático de Morris 2 Teste Campo Aberto (CA) 3 Reconhecimento de Objetos (RO) Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de os Ensaios de Imunoprecipitação para detecção dos subtipos de receptores	.44 .44 .46 .47 .48
3.5. 3.5. 3.5. 3.6 rato 3.7 mus	Testes comportamentais 1 Labirinto Aquático de Morris 2 Teste Campo Aberto (CA) 3 Reconhecimento de Objetos (RO) Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de os Ensaios de Imunoprecipitação para detecção dos subtipos de receptores scarínicos (M1 – M5)	.44 .46 .47 .48 .48
<ol> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.6</li> <li>rate</li> <li>3.7</li> <li>mus</li> <li>3.7.</li> </ol>	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)         3 Reconhecimento de Objetos (RO)         Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de         os         Ensaios de Imunoprecipitação para detecção dos subtipos de receptores         scarínicos (M1 – M5)         1 Drogas e Reagentes	.44 .44 .46 .47 .47 .48 .50 .50
3.5. 3.5. 3.5. 3.6 rate 3.7 mus 3.7. 3.7.	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)         3 Reconhecimento de Objetos (RO)         Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de         os         Ensaios de Imunoprecipitação para detecção dos subtipos de receptores         scarínicos (M1 – M5)         1 Drogas e Reagentes         2 Anticorpos	.44 .44 .46 .47 .47 .50 .50
<ol> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.6</li> <li>rate</li> <li>3.7</li> <li>mus</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> </ol>	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)         3 Reconhecimento de Objetos (RO)         Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de         os         Ensaios de Imunoprecipitação para detecção dos subtipos de receptores         scarínicos (M1 – M5)         1 Drogas e Reagentes         2 Anticorpos         3 Substâncias radioativas	.44 .44 .46 .47 .47 .50 .50 .50
<ol> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.6</li> <li>rato</li> <li>3.7</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> </ol>	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)         3 Reconhecimento de Objetos (RO)         Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de         os         Ensaios de Imunoprecipitação para detecção dos subtipos de receptores         scarínicos (M1 – M5)         1 Drogas e Reagentes         2 Anticorpos         3 Substâncias radioativas         4 Tampão Tris HCI para ensaios com radioligantes	.44 .44 .46 .47 .47 .50 .50 .50 .50
<ol> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.6.</li> <li>rato</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> </ol>	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)         3 Reconhecimento de Objetos (RO)         Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de         os.         Ensaios de Imunoprecipitação para detecção dos subtipos de receptores         scarínicos (M1 – M5)         1 Drogas e Reagentes         2 Anticorpos         3 Substâncias radioativas         4 Tampão Tris HCI para ensaios com radioligantes         5 Outros materiais	.44 .44 .46 .47 .47 .50 .50 .50 .50 .50 .50
<ol> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.5.</li> <li>3.6.</li> <li>rato</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> <li>3.7.</li> </ol>	Testes comportamentais         1 Labirinto Aquático de Morris         2 Teste Campo Aberto (CA)         3 Reconhecimento de Objetos (RO)         Avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de         os         Ensaios de Imunoprecipitação para detecção dos subtipos de receptores         scarínicos (M1 – M5)         1 Drogas e Reagentes         2 Anticorpos         3 Substâncias radioativas         4 Tampão Tris HCI para ensaios com radioligantes         5 Outros materiais         6 Isolamento do hipocampo de ratos	.44 .44 .46 .47 .47 .50 .50 .50 .50 .50 .51 .51

3.7.8	Detecção dos subtipos de receptores muscarínicos (M1 - M5)	52
3.7.9	Determinação da ligação específica do [ <sup>3</sup> H]Quinuclidynil benzilate ([ <sup>3</sup> H]QNB)	
em pr	eparação de membrana semipurificada de ratos controle (CTR)	52
3.7.10	Solubilização do complexo [³H]QNB-receptor e determinação da ligação	
espec	ífica	52
3.7.11	Imunoprecipitação dos subtipos de receptores muscarínicos	53
3.8 Aı	nálise Estatística	54
4 DE	LINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
5 RE	SULTADOS	56
5.1 Av	valiação do aprendizado e memória espacial no labirinto aquático de	
Morris	s em ratos – Período P1	56
5.2 Av	valiação do aprendizado e memória espacial no labirinto aquático de	
Morris	s em ratos injetados icv-STZ – Período P2	59
5.3 Av	valiação do aprendizado e memória espacial no labirinto aquático de	
Morris	s em ratos injetados icv-STZ e tratados com geleia real – Período P36	51
5.4 Av	valiação da atividade exploratória no Teste de Campo Aberto em ratos	
injeta	dos icv-STZ e tratados com geleia real	63
5.5 Av	valiação da memória de curta e longa duração a partir do Teste de	
Recor	nhecimento de Objetos em ratos injetados icv-STZ e tratados com geleia	l
real	θ	35
5.6 Av	valiação da Imuno-Histoquímica em ratos injetados icv-STZ e tratados	
com g	geleia real	66
5.6.1	Imunorreatividade para GFAP – Giro Denteado	66
5.6.2	Imunorreatividade para GFAP – Hilo do Giro Denteado	58
5.6.3	Imunorreatividade para GFAP – Região CA3	70
5.6.4	Imunorreatividade para GFAP – Região CA1	72
5.6.5	Imunorreatividade para IBA1 – Giro Denteado	74
5.6.6	Imunorreatividade para IBA1 – Hilo do Giro Denteado	76
5.6.7	Imunorreatividade para IBA1 – Região CA3	78
5.6.8	Imunorreatividade para IBA1 – Região CA1	30
5.7 Av	valiação do efeito da administração intracerebroventricular de	
estrep	otozotocina (STZ) e/ou do tratamento com geleia real na expressão de	
cada	subtipo de receptor muscarínico (M1 - M5)	32

5.7.1	Porcentagem de Imunoprecipitação de cada Subtipo de Receptor Mu	iscarínico
(M1 –	M5) em Hipocampo de Animais Controle (CTR)	82
5.7.2	Expressão do Receptor Muscarínico M1	83
5.7.3	Expressão do Receptor Muscarínico M2	84
5.7.4	Expressão do Receptor Muscarínico M3	85
5.7.5	Expressão do Receptor Muscarínico M₄	86
5.7.6	Expressão do Receptor Muscarínico M₅	87
6 DIS	CUSSÃO	88
7 CO	NCLUSÃO	99
REFE	RÊNCIAS*	100

## 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) foi primeiramente relatada há pouco mais de um século (1907) pelo médico e neuropatologista alemão Alois Alzheimer e, quase simultaneamente, pelo também médico e neuropatologista Tcheco Oskar Fischer (Goedert, 2009). Alzheimer relatou durante um congresso da sociedade de psiquiatras, na cidade alemã de Tübingen (sudoeste da Alemanha), o caso de Auguste Deter, uma paciente que havia sido internada em um asilo psiquiátrico em Frankfurt em 1901 e que apresentava alterações de comportamento, surtos de paranoia, perda de memória e delírios. Ele descreveu a doença como sendo um tipo peculiar de demência. Progressivamente os sintomas de Deter foram evoluindo até a sua morte em 1906 aos 55 anos (um caso de demência pré-senil). Seu cérebro foi examinado e as análises histológicas revelaram a presença de placas amiloides, emaranhados neurofibrilares e perda maciça de neurônios (Cipriani et al., 2011). No mesmo ano dos relatos de Alzheimer, Oskar Fischer relatou a presença de placas neuríticas em 12 casos de demência senil, além de fornecer a primeira descrição sobre estas placas. Essas descobertas delinearam a entidade clínico-patológica que hoje é denominada como doença de Alzheimer (Goedert, 2009).

Atualmente a DA é classificada como um distúrbio neurodegenerativo progressivo e multifatorial caracterizado pela deterioração da função cognitiva, perda de memória, alterações comportamentais além de uma série de sintomas neuropsiquiátricos que comprometem as atividades da vida diária dos indivíduos acometidos (Lane et al., 2018; Reitz et al., 2011). São conhecidas e classificadas duas formas da DA: a DA de início tardio ou esporádica (DAE), cuja patogenia não é bem conhecida, possui como principal fator de risco o envelhecimento, acomete os pacientes a partir dos 65 anos de idade (representa cerca de 95% dos casos) com progressão lenta, ocorrendo de forma esporádica. A outra forma é a DA familial (DAF), caracterizada por um início precoce do quadro clínico (antes dos 60 anos), com progressão rápida da doença. A DAF está associada a um padrão de recorrência familiar com forte componente genético (transmissão autossômica dominante), representa apenas cerca de 5% dos casos. Ambas as formas da doença compartilham

de características patológicas em comum (Bekris et al., 2010; Smith, 1999; Masters et al., 2015).

A presença de placas extracelulares compostas por peptídeos beta-amilóides (Aβ), emaranhados neurofibrilares intracelulares compostos de formas agregadas hiperfosforiladas da proteína Tau, perda neuronal (Kocahan e Dogan, 2017; Jack et al., 2013), disfunção do sistema colinérgico, ativação da glia e neuroinflamação configuram entre as principais características histopatológicas da DA (Selkoe, 2001; Ferreira et al., 2016).

A DA representa a principal causa de demência no mundo e é responsável por mais da metade dos casos de pacientes acometidos (Prendecki et al., 2020). Dados estatísticos mostram que mais de 44 milhões de pessoas no mundo vivem hoje com demência; é previsto que o número de acometidos poderá ultrapassar os 131 milhões até 2050, dado o crescimento populacional e o aumento da expectativa de vida sobretudo nos países desenvolvidos (Lane et al., 2018). O custo global para suprir essa demanda segundo estimativas ultrapassa os US\$ 700 bilhões por ano (Cacabelos, 2018; Ernst e Hay, 1994; Bloom et al., 2003). Importantes descobertas foram feitas nas últimas décadas sobre a patogênese, prevenção e fatores de risco para a DA, porém, avanços terapêuticos significantes ainda não foram alcançados. Os medicamentos aprovados atualmente possuem pouca influência sobre a evolução da doença (Frozza et al., 2018), não possuem um custo benefício viável além de não serem desprovidos de efeitos adversos (Cacabelos et al., 2016; Cacabelos, 2018). Por outro lado, evidências recentes sugerem que atrasos no quadro inicial da DA (mesmo modestos) podem alterar a trajetória da demência, retardar o comprometimento cognitivo, reduzir internações e melhorar a qualidade de vida (Davis et al., 2018). Tendo em vista os fatos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Alzheimer's Disease International (ADI) reconheceram a DA como uma prioridade global de saúde pública (World Health Organization, 2012).

### 1.2 Modelo Animal da DAE Induzido por Estreptozotocina

Diversas hipóteses têm sido propostas nas últimas décadas com objetivo de explicar a patogênia da DA, dentre elas podemos citar: a desregulação da cascata amiloide, hiperfosforilação da proteína Tau, disfunção mitocondrial (Swerdlow et al., 2010), estresse oxidativo (Kozlov et al., 2017), neuroinflamação e hiperexcitabilidade

central (Husna et al., 2020), alterações da atividade de quinases (Rosenberger et al., 2016), disfunção de fatores tróficos (Schindowski et al., 2008), disomeostase de cálcio (Green et al., 2007), fatores ambientais (Killin et al., 2016) e alterações no metabolismo energético (Błaszczyk, 2020; Muddapu et al., 2020). Nos últimos 25 anos a hipótese da cascata amiloide e a patologia da Tau permaneceram no cerne das discussões a respeito do provável agente ou fenômeno inicial causador da DA (Gulisano et al., 2018). Em 1992 Hardy e Higgins propuseram a hipótese da cascata amiloide. Segundo este modelo, a neurodegeneração na DA seria consequência da deposição de placas extracelulares compostas por peptídeos beta amiloides (A $\beta$ ), oriundos da clivagem anormal da proteína precursora de amilóides (APP). A APP está presente na membrana plasmática de diferentes tipos celulares, incluindo neurônios, astrócitos e outras células gliais. Em condições não amiloidogênicas, ela participa de diferentes processos de regulação da homeostase, inclusive na excitabilidade neuronal, resistência dos neurônios ao estresse oxidativo e metabólico, melhora da plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (Mucke e Selkoe, 2012; Mattson, 2004). Por outro lado, a proteólise da APP pela via amiloidogênica, pelas enzimas  $\beta$ secretase e y-secretase, pode culminar em formas reativas distintas de peptídeos Aß, incluindo fibrilas, protofibrilas e oligômeros polimórficos, produtos de agregação e polimerização de Aβ dentro da placa (Barage e Sonawane, 2015). Foi proposto por diferentes autores que as propriedades neurotóxicas de Aß eram dependentes de seu estado de montagem/interação em conjuntos oligoméricos solúveis (Krafft e Klein, 2010) e que essas moléculas seriam responsáveis por desencadear o gatilho patológico da complexa cascata de eventos presentes na DA, o que inclui: formação dos emaranhados neurofibrilares via proteína tau, processo inflamatório com ativação da micróglia e dos astrócitos, estresse oxidativo, perda celular e demência (Ferreira et al., 2015; Carrillo-Mora et al., 2014). Embora existam indícios que sugerem que APP e Aβ participam dos processos centrais do desenvolvimento inicial da DA, muitas evidências, no entanto, questionam a hipótese da cascata amilóide como evento principal na patogênese da DA (Ricciarelli e Fedele, 2017). Diferentes estudos que tinham como foco estratégias anti-Aβ fracassaram (Braczynski et al., 2017). Imunização passiva com uso de anticorpo monoclonal humanizado (Salloway et al., 2014; Lilly, 2016) e imunização ativa anti-Aβ (Robinson et al., 2004; Gilman et al., 2005) são exemplos de estratégias que falharam, além disso, a falta de modelos animais que mimetizem a fisiopatologia do Aß humano também representa um

problema a ser resolvido (Drummond e Wisniewski, 2017). Estudos têm demonstrado que existe uma falta de correlação entre indivíduos que apresentaram acúmulo de Aß e a perda neuronal, declínio cognitivo ou perda de memória (Katzman et al., 1988; Villemagne et al., 2011). Com o fracasso de tratamentos direcionados ao peptídeo Aß a hipótese Tau recebeu mais atenção dos pesquisadores nos últimos anos. Entretanto, apesar da correlação entre o aumento da gravidade dos déficits cognitivos na demência e o aumento nos níveis de oligômeros solúveis de Tau e os emaranhados (NFTs) (Kametani et al., 2018; Fan et al., 2020), ensaios clínicos direcionados à inibidores de guinases, estabilizadores de microtúbulos, diminuição da agregação de tau e drogas imunoterapêuticas apresentaram toxicidade, efeitos adversos e ainda não relataram resultados significativos (Fan et al., 2020). Com o surgimento de novos achados no cenário científico, as hipóteses têm sofrido modificações para se adaptar às novas descobertas encontradas. A busca pelo diagnóstico com detecção préclínica de biomarcadores (Mosconi et al., 2008), estratégias que envolvem agentes modificadores da doença, fármacos direcionados a múltiplos alvos, terapias combinadas (Kabir et al., 2020), além da proposição de hipóteses que sugerem outros fenômenos primários como ligados ao início da doença, são algumas das estratégias atuais para combater a DA (Chen et al., 2013; Husna et al., 2020). Em contrapartida aos fracassos encontrados na busca pelo tratamento/estratégias para a DA, hipóteses alternativas, como a da desregulação do metabolismo energético e do metabolismo da glicose têm sido propostas (De Felice, 2013).

Estudos demostraram que existe uma relação direta entre a DA e alterações no metabolismo da glicose antes mesmo do início do declínio cognitivo diagnosticado clinicamente. Essas pesquisas se sustentam em evidências decorrentes de estudos *in vitro* e *in vivo* e sugerem que o hipometabolismo cerebral, anormalidades na via da insulina e distúrbio na utilização de energia podem levar a insuficiência da função neuronal, redução do número de neurônios, e por último contribuir para a cascata neuropatológica que dá início ao declínio cognitivo na DA (Cunnane et al., 2011; Tumminia et al., 2018; Chornenkyy et al., 2019). Alterações moleculares e patológicas em cérebros humanos (post-mortem) de pacientes com DA mostraram uma relação com a diminuição da expressão de genes relacionados à produção de insulina, Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF) e seus receptores (De La Monte, 2008). É importante ressaltar que a DA e o Diabetes mellitus (DM) possuem em comum muitas características patológicas: a sinalização de insulina prejudicada, aumento dos

níveis de beta-amilóide (A $\beta$ ) e da proteína Tau Hiperfosforilada, glia reativa, estresse oxidativo, déficits de memória e declínio cognitivo em idosos. Além disso, a DM representa um fator de risco para o desenvolvimento da DA (Kandimalla et al., 2017; Ahn et al., 2019). Todas essas características moleculares e celulares compartilhadas levaram muitos pesquisadores a propor o termo 'Diabetes Tipo 3' (que ainda é discutida) para a DA (Kandimalla et al., 2017). O cérebro humano é um voraz consumidor de energia, sua demanda é responsável por 20% do consumo de energia corporal que é suprida quase que inteiramente pelo metabolismo de glicose, utilizada em grande parte para a transmissão sináptica. Estudos evolutivos indicam que o aumento na utilização de glicose e a expressão de genes do metabolismo energético estão associados ao surgimento de funções cognitivas superiores em humanos (Magistretti et al., 2015). A partir dessa lógica, não seria inviável propor que deficiências na utilização ou disponibilidade de glicose, assim como outras disfunções metabólicas, possam ser os agentes responsáveis pela prevalência de patologias neurodegenerativas como a DA (Sun et al., 2020). Em virtude deste cenário, a injeção intracerebroventricular (icv) de estreptozotocina passou a ser utilizada por diversos grupos como um modelo animal experimental não transgênico seguro, por induzir muitas das deficiências moleculares, histológicas e comportamentais presentes em indivíduos com DAE (Rostami et al., 2017). A injeção icv-STZ no cérebro de ratos provoca a diminuição dos níveis de glicose, fosforilação da tau, agregação amiloide, aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE), diminuição da glicose e transportadores de glicose (GLUT), aumento dos níveis de cálcio corticais e hipocampais, ativação de astrócitos e micróglia, baixa atividade mitocondrial, aumento do estresse do reticulo endoplasmático e morte neuronal (Biswas et al., 2018). Investigações in vitro também revelaram que o tratamento com STZ foi capaz de induzir a diminuição dos níveis de captação de glicose, aumento da atividade da AChE, fosforilação da tau e agregação amiloide, estresse mitocondrial, diminuição significativa na viabilidade celular dos neurônios, danos ao DNA e outros efeitos deletérios (Biswas et al., 2016).

A estreptozotocina (STZ) é um composto de glicosamina-nitrosureia derivado de bactérias do solo *Streptomyces achromogenes*. Foi descoberta e caracterizada pela primeira vez em 1960 e apresenta característica estável em pH 4,5. Inicialmente foi adotada como antibiótico, mas deixou de ser usada por apresentar alta toxicidade para as células  $\beta$  produtoras de insulina do pâncreas (Zhang et al., 2020). A sua

utilização também já foi feita em testes voltados ao tratamento do câncer de pâncreas em humanos (Moertel et al., 1980). Atualmente é principalmente administrada em altas doses por vias periféricas como ferramenta eficaz para induzir diabetes em animais experimentais já que é seletivamente tóxica para às células beta pancreáticas produtoras de insulina. Por outro lado, alguns autores têm proposto que a injeção intracerebroventricular de STZ (icv-STZ), em baixas doses, provoca danos na sinalização/comunicação entre a insulina e seu receptor (IR), essas alterações geram a dessensibilização desses receptores e consequentemente problemas no metabolismo energético das células nervosas, entretanto, os mecanismos responsáveis por esses eventos ainda necessitam ser melhor elucidados (Grieb, 2016).

A administração icv-STZ inibe as proteínas da via PI3K/AKT e produz um aumento da atividade/fosforilação da isoforma do GSK3, o GSK3β. Esse processo está diretamente envolvido na acumulação do peptídeo beta amiloide e também na hiperfosforilação da Tau (Jolivalt et al., 2010; Deng et al., 2009). A injeção icv-STZ também foi responsável por diminuir de forma acentuada os níveis de GLUT1 e GLUT3 nos cérebros de ratos quando comparados aos animais do grupo controle. Desta forma, todas essas perturbações poderiam justificar os prejuízos moleculares, cognitivos e de memória presentes nos roedores submetidos ao modelo de injeção icv-STZ para indução da DAE. Em 1998, Lannert e Hoyer demonstraram que a injeção icv-STZ induz resistência central à insulina e alterações no metabolismo da glicose. Mais recentemente, outras pesquisas relataram a presença de estresse oxidativo, além de inflamação e déficits cognitivos nos animais submetidos a esse modelo (Majkutewicz et al., 2018). Em adição, outros autores relataram que a injeção icv-STZ também induziu citotoxicidade que resultou na fragmentação do DNA e perda de neurônios no hipocampo de ratos por apoptose (Sharidi et al., 2019). Em um estudo feito anteriormente por nosso grupo, mostramos que à administração icv-STZ induziu efeitos deletérios no hipocampo de ratos. Esses danos foram representados por déficit cognitivo e acentuada neurodegeneração, além disso, também foi observado redução da neurogênese e aumento do estresse oxidativo (Silva, 2017; Silva et al., 2020).

### 1.3 Hipocampo

A formação hipocampal compreende o hipocampo, o giro dentado e o subiculum. O hipocampo e regiões corticais associadas formam o assoalho do corno temporal do ventrículo lateral. Juntas estas estruturas são responsáveis por importantes funções como componentes do sistema límbico e estão intimamente envolvidas em processos emocionais, de aprendizado, formação da memória, comportamento, além de possuir grande capacidade de plasticidade sináptica e estrutural (Knierim, 2015). O hipocampo está localizado no lobo temporal (região medial) de cada hemisfério encefálico e pode ser dividido em duas regiões principais, o giro denteado (GD) e o Corno de Ammon (CA) que por sua vez é diferenciado anatomicamente e funcionalmente em subcampos distintos denominados de CA1, CA2 e CA3 com base nas projeções das fibras dos neurônios piramidais e nas diferenças morfológicas entre as células (Cherubini e Miles, 2015) (Fig.1). O giro dentado é formado por três camadas de células: camada molecular, camada granular e a camada polimórfica (hilo). As células granulares representam o principal tipo de neurônios presente no GD, porém, vale destacar que no hilo há um estrato polimórfico de células, interneurônios e fibras musgosas provenientes das células granulares (Amaral et al., 2007; Scorza, 2005). Na formação hipocampal, conexões feitas envolvendo a via perfurante, projeções oriundas das fibras musgosas que criam conexões com a região CA3 e o hilo, e conexões feitas através da via das fibras colaterais de Schaffer, formam um circuito trissináptico em série que conecta o hipocampo ao córtex entorrinal (EC) (Amaral et al., 2007). Embora possua um importante papel na regulação de processos de aprendizagem, memória, navegação espacial, comportamento emocional, regulação das funções hipotalâmicas, entre outros, o hipocampo é uma estrutura plástica e vulnerável que pode ser danificada por diferentes estímulos, como estresse por exemplo. Além disso, é alvo de injúrias em uma variedade de distúrbios neurológicos e psiguiátricos, incluindo na DA (Anand e Dhikav, 2012).



Figura 1 – Imagem de fatia coronal do eixo transversal do hipocampo com esquema simplificado da conectividade entre as estruturas que formam o circuito trissináptico na formação hipocampal. As linhas pretas representam a conexão trissináptica onde aferências vindas da camada II do EC inervam células granulares e em cesto na camada intermediária (camada granular) no GD e os axônios dos neurônios granulares se comunicam com os dendritos apicais dos neurônios piramidais em CA3, por fim, projeções axonais de CA3 realizam sinapses axodendríticas com os neurônios piramidais de CA1. As linhas vermelhas representam outras vias importantes no hipocampo que incluem projeções diretas do EC para todos os três campos de CA: a via eferente do hipocampo para o EC através do SUB, a projeção de feedback de CA3 para DG e os circuitos colaterais oriundos de CA3. EC: Córtex entorrinal, DG: Giro denteado, CA, Corno de Amon, SUB: Subiculum. Adaptado de (Knierim, 2015).

## 1.4 Papel dos Astrócitos e da Micróglia na Neuroinflamação

Estudos realizados nas últimas décadas têm apresentado importantes evidências a respeito do papel das células gliais no SNC, esses dados mostram que a glia é um componente imprescindível para a homeostasia do cérebro e que também possui funcionamento ativo em seus processos patológicos (Gomes et al., 2013). Os astrócitos são as células da glia mais abundantes (metade das células do cérebro) e apesar de terem sido descritos anteriormente apenas como células de suporte aos neurônios, desempenham uma grande variedade de funções. Astrócitos atuam como participantes ativos no desenvolvimento e na plasticidade de sinapses e espinhos dendríticos, regulam a transmissão de gliotransmissores importantes (glutamato e ATP) e o seu funcionamento e interação são cruciais para a atividade normal do cérebro (Blanco-Suárez et al., 2017). As células da micróglia são classificadas como as células imunes do sistema nervoso, elas atuam durante a ocorrência de danos

cerebrais, injúrias ou infecções e iniciam uma resposta imune liberando mediadores inflamatórios, realizam a fagocitose de corpos estranhos e participam do reparo e regeneração de tecidos, ou seja, são essenciais para a homeostase do SNC (Karthikeyan et al., 2016; Sarlus et al., 2017). Os astrócitos e a micróglia são importantes agentes do desenvolvimento neural, da manutenção das conexões sinápticas e da homeostase no cérebro saudável. Entretanto, condições associadas à perda de homeostase ou alterações teciduais podem induzir um aumento na ativação dessas células na sua forma reativa e produzir neuroinflamação (Sawikr et al., 2017). A neuroinflamação é um fenômeno presente e característico nas doenças neurodegenerativas, além disso, desempenha um papel significativo a partir da sua participação/envolvimento nos processos fisiopatológicos presentes nessas doenças, inclusive na DA; tais eventos dão sustentação aos argumentos que sugerem que a neuroinflamação pode exercer alguma participação na patogênese e na evolução da DA, produzindo aumento na ativação de células reativas e consequentemente o aumento de citocinas pró-inflamatórias (Karthikeyan et al., 2016; Calsolaro e Edison, 2016; Sawikr et al., 2017). Neste contexto, torna-se necessário novas investigações sobre os mecanismos envolvidos na astrogliose e microgliose em doenças neurodegenerativas, assim como a descoberta de novas terapias e produtos que configurem a modificação da atividade inflamatória dessas células.

### 1.5 Sistema Colinérgico e os Receptores Colinérgicos Muscarínicos

A acetilcolina atua como um dos principais neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). No SNC, ela está envolvida na termoregulação, controle motor e processos cognitivos como atenção, memória, aprendizagem e alerta. No SNP, via inervação parassimpática, a acetilcolina controla funções como contração da musculatura lisa, homeostase, modulação de taxa e força cardíaca e secreção glandular (Westfall e Westfall, 2011; Kessler et al., 2017; Naser e Kuner, 2018). Ao longo dos anos várias outras descobertas importantes evidenciaram o papel da acetilcolina na modulação de diferentes eventos celulares como a proliferação, diferenciação, secreção e migração (Wessler e Kirkpatrick, 2008; Kessler et al., 2017; Wessler e Kirkpatrick, 2017). A acetilcolina também está envolvida na regulação do processo de apoptose, eventos angiogênicos, organização do citoesqueleto e movimentos de íons e água (Wessler e Kirkpatrick, 2008; Campoy et

al., 2016). Além disso, a acetilcolina tem um papel na regulação da resposta antiinflamatória (RosasBallina et al., 2011), secreção de insulina (Rodriguez-Diaz et al., 2011) e função cardíaca (Roy et al., 2016).

Os receptores para a acetilcolina se dividem em duas classes principais: nicotínicos e muscarínicos. Os receptores nicotínicos pertencem à família de receptores ionotrópicos que, quando ativados, adquirem a conformação de canal aberto permeável aos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, mediando à transmissão excitatória rápida. Esses receptores são constituídos por cinco subunidades proteicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ) e estão distribuídos principalmente na junção neuromuscular e SNC (Ventura et al., 2010). Por outro lado, os receptores colinérgicos muscarínicos são do tipo metabotrópicos e pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e, sua ativação leva a produção de segundos mensageiros no interior da célula. Estes serão o alvo de nosso estudo. Os receptores colinérgicos muscarínicos de acetilcolina pertencem à família de receptores glicoproteicos de membrana acoplados a proteínas heterotriméricas regulatórias, ligados ao nucleotídeo de guanina (proteínas G) (Gibbons e Dean, 2016). Os cinco subtipos de receptores muscarínicos foram identificados em vários tecidos por estudos funcionais e com radioligantes (Eglen et al., 1996; Caulfield e Birdsall, 1998; Wang et al., 2001), por técnicas de biologia molecular (Kubo, T. et al., 1986; Kubo, Tai et al., 1986; Bonner et al., 1987; Bonner et al., 1988; Wess, 2004) e por técnicas imunológicas (Zeng e Wess, 1999; Khan et al., 2002).

Cinco genes distintos que codificam estes receptores foram clonados e denominados m1, m2, m3, m4 e m5. Estes cinco genes não apresentam introns em sua sequência codificadora, e exibem alta homologia entre as espécies mamíferas (Hulme et al., 1990; Hall et al., 1993; Eglen et al., 1996; Ventura et al., 2010). Os cinco clones correspondem respectivamente, aos receptores farmacologicamente caracterizados como  $M_1$  a  $M_5$ , de acordo com sua afinidade por antagonistas seletivos e sinalização intracelular (Kubo, T. et al., 1986; Kubo, Tai et al., 1986; Hulme et al., 1990; Caulfield, 1993; Wess, 1993; Hulme et al., 1995; Eglen et al., 1996; Wess, 1996; Lanzafame et al., 2003).

Cada subtipo de receptor muscarínico pode estar acoplado a várias vias de sinalização intracelulares (Ballinger et al., 2016; Lebois et al., 2018). Os subtipos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  estão principalmente relacionados com a estimulação da hidrólise de fosfoinositídeos de membrana, pela ativação da fosfolipase C $\beta$ , gerando IP<sub>3</sub> (1,4,5-trisfosfato de inositol), que mobiliza o cálcio dos estoques intracelulares e DAG

(diacilglicerol), levando a ativação de proteína quinase C (Bonner et al., 1988; Peralta et al., 1988; Ashkenazi et al., 1989; Liao et al., 1989; Ehlert, 2003; Lanzafame et al., 2003). Por outro lado, os subtipos M<sub>2</sub> e M<sub>4</sub> estão envolvidos principalmente com a inibição de algumas isoformas de adenililciclase e, portanto, com a diminuição da formação de AMP cíclico (3',5'-monofosfato cíclico de adenosina) e ativação da proteína quinase A, responsável pela fosforilação de várias proteínas, como por exemplo, canais de cálcio e proteínas nucleares, que regulam a expressão gênica (Ashkenazi et al., 1987; Peralta et al., 1988; Ashkenazi et al., 1989). Foi também mostrado que a redução dos níveis de AMP cíclico pela ativação dos receptores muscarínicos M<sub>2</sub> pode também ocorrer por meio da ativação da fosfodiesterase (Han et al., 1998).

#### 1.6 Receptores Colinérgicos Muscarínicos no Sistema Nervoso Central

No SNC, os receptores colinérgicos muscarínicos estão envolvidos na regulação de várias funções, como por exemplo, cognitiva, comportamental, sensorial, motora e autonômica (Brown, 2010; Ballinger et al., 2016; Lebois et al., 2018). No encéfalo de ratos machos, estudos de ligação utilizando radioligantes, de imunoprecipitação e ensaios de reação da transcripitase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) mostraram a presença dos cinco subtipos de receptores muscarínicos e uma expressão diferencial destes subtipos nas várias áreas cerebrais (Levey, 1993; Kruse et al., 2014).

Particularmente no hipocampo, foi demonstrada a presença do RNA mensageiro para os cinco subtipos. Estudos de imunohistoquímica detectaram uma maior população do subtipo M<sub>1</sub> (55%) e menor expressão dos subtipos M<sub>2</sub> (17%), M<sub>3</sub> (10%) e M<sub>4</sub> (15%) (Levey, 1993). Em hipocampo de camundongos machos, geneticamente modificados, deficientes em um dos cinco genes que codificam os subtipos de receptores muscarínicos, estudos de ligação utilizando o antagonista muscarínico [<sup>3</sup>H] N-Metil-Escopolamina ([<sup>3</sup>H]NMS) mostraram uma maior expressão do subtipo M<sub>1</sub> (69%), seguido pelo subtipo M<sub>2</sub> (30%), M<sub>3</sub> (17%) e M<sub>4</sub> (9%) e baixa expressão do subtipo M<sub>5</sub> (1%) (Oki et al., 2005). Ensaios de imunoprecipitação realizados em nosso laboratório também mostraram, em hipocampos de ratas fêmeas na fase de proestro, um perfil de expressão para os diferentes subtipos similares ao reportado na literatura: 61%, 23%, 8%, 6%, e 0,6%, respectivamente, para os subtipos

 $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  e  $M_5$  (Cardoso et al., 2010).

O papel funcional dos cinco subtipos de receptores muscarínicos, nas diversas funções cerebrais, não está totalmente esclarecido. Evidências farmacológicas sugerem que a ativação do subtipo M<sub>1</sub> pode melhorar os processos cognitivos e a plasticidade sináptica no hipocampo (Scarr, 2012; Ballinger et al., 2016). A administração de agonistas seletivos para o receptor muscarínico M<sub>1</sub> pode ser uma importante ferramenta terapêutica na doença de Alzheimer, no comprometimento de memória associado ao envelhecimento e no comprometimento cognitivo associado com a esquizofrenia (Scarr, 2012; Ballinger et al., 2016). Na doença de Alzheimer, agonistas de receptor M<sub>1</sub> podem ter um benefício adicional uma vez que diminuem a formação da placa amilóide citotóxica, pela modulação positiva do precursor solúvel da proteína amilóide (APP) (Scarr, 2012; Ballinger et al., 2016).

Com relação ao receptor M<sub>2</sub>, foi mostrado que está amplamente expresso tanto na pré- como na pós-sinapse, mas sua função nos processos cognitivos não está totalmente esclarecida e com resultados controversos na literatura (Haga et al., 2012; Scarr, 2012; Ballinger et al., 2016).

O receptor muscarínico  $M_3$  é significativamente menos distribuído no SNC. Estudos têm mostrado o papel central desse subtipo. Em camundongo deficiente do gene que codifica este receptor foi mostrado que os animais se alimentam menos e são mais magros, sugerindo um papel na regulação da ingestão de alimentos (Yamada et al., 2001; Kruse et al., 2014).

No SNC o subtipo M<sub>4</sub> está amplamente distribuído no estriado e, além disso, co-localizado com receptores dopaminérgicos (Bonsi et al., 2011). Em animais deficientes desse subtipo foram retratados um aumento da atividade locomotora basal e uma hipersensibilidade do efeito locomotor, estimulado pela ativação de receptores D1 de dopamina, indicando uma interação funcional entre esses dois sistemas de receptores (Havekes et al., 2011).

Com relação ao receptor muscarínico do subtipo M<sub>5</sub>, a primeira hipótese de seu envolvimento na regulação vascular cerebral foi demonstrada por Wang & Friedman (Wang e Friedman, 1994). Posteriormente, estudos de hibridização *in situ* e imunohistoquímica tem mostrado a presença do receptor M<sub>5</sub> nas células endoteliais do círculo de Willis e artérias cerebrais (Tayebati et al., 2003). Estudos *in vivo* utilizando ressonância magnética em animais deficientes do gene que codifica o receptor M<sub>5</sub> mostraram uma redução do fluxo sanguíneo no córtex, hipocampo, gânglio basal e tálamo. Nos neurônios piramidais do hipocampo, estas mudanças estão associadas com a redução no número de espinhas, atrofia dendrítica, diminuição na atividade excitatória espontânea e, consequentemente, comprometimento da memória (Araya et al., 2006). Além disso, tem sido constatado que o subtipo  $M_5$  é possível alvo para o tratamento de dependência química (Raffa, 2009; Dencker et al., 2012; Scarr, 2012).

### 1.7 Receptores Colinérgicos Muscarínicos na DA

Na DA, deficiências como a degeneração dos neurônios colinérgicos, hipofunção colinérgica e perda de sinapses, são fenômenos presentes e com potencial para gerar déficits em todos os aspectos da cognição e do comportamento, incluindo o processamento de informações corticais e hipocampais (Levey, 1993; Jiang et al., 2014; Ferreira-Vieira et al., 2016). Diferentes investigações realizadas nas últimas décadas têm reiterado que na DA a neurotransmissão e o desempenho do sistema colinérgico encontram-se comprometidos (Pearson et al., 1983; Avery et al., 1997; Lebois et al., 2017; Moran et al., 2019). Além disso, uma variedade de sintomas neuropsiguiátricos, incluindo, agitação, apatia, depressão, delírios (Rosenberg et al., 2015), comportamento sem propósito, desinibição, distúrbios do sono e apetite, etc, têm sido relacionados à deficiência colinérgica (Cummings e Back, 1998). A degeneração de neurônios colinérgicos decorrentes do prosencéfalo basal figura dentre as principais características presentes na neuropatologia na DA, mesmo em estágios iniciais (Whitehouse et al., 1981; Goekoop et al., 2006). Os principais componentes da sinalização colinérgica estão comprometidos na DA. Os níveis dos dois subtipos de colinesterases, a acetilcolinesterase (AChE) e o butirilcolinesterase (BuChE) (Winslow et al., 2011), além do transportador vesicular de acetilcolina (VAChT), estão reduzidos (Kuhl et al., 1996). A atividade da colina acetiltransferase (ChAT) no hipocampo (Araujo et al., 1988) e no córtex também foram descritos como reduzidas (DeKosky et al., 1992; Quirion et al., 1993). Esses achados fornecem sustentação para as hipóteses colinérgicas e colocam a deficiência do sistema colinérgico como um dos principais fatores na disfunção da memória nos pacientes com DA (Schliebs et al., 2006). Atualmente, as principais opções medicamentosas para o tratamento da DA, responsáveis por produzir melhorias clínicas relevantes, são baseadas na administração de inibidores de colinesterases e /ou moduladores de

receptores NMDA (Raina et al., 2008). Entretanto, problemas como a limitação no tempo de eficácia na restauração da neurotransmissão colinérgica (não mais que três anos), a baixa ou nenhuma propriedade modificadora da doença, e os efeitos adversos, ainda precisam ser solucionados (Grossberg, 2003; Inglis, 2002; Hampel et al., 2018).

Diante deste cenário, a modulação do sistema muscarínico através de medidas que visem a inibição ou estimulação de receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR), representa uma estratégia viável no tratamento de diferentes doenças e distúrbios em que o sistema colinérgico está comprometido (Kudlak e Tadi, 2020). No SNC, a regulação de diferentes processos envolvendo funções cerebrais superiores, incluindo aprendizagem e memória, pode ser mediada pela estimulação ou inibição de mAChR. Embora existam vários estudos relatando uma redução nos níveis de mAChR na DA, ainda não há um consenso sobre a questão.

Pesquisas post-mortem com tecido cerebral de pacientes com DA, relataram uma diminuição significativa nos níveis do receptor muscarínico M1 em diferentes regiões cerebrais, inclusive no hipocampo e no córtex (Rodríguez-Puertas et al., 1997; Verma et al., 2018; Wang et al., 1992; Yi et al., 2020). Com relação ao subtipo M<sub>2</sub>, foi relatado uma redução acentuada nas regiões cortical e hipocampal (Araujo et al., 1988). Além disso, uma pesquisa que investigou a relação entre os níveis de receptores muscarínicos (M<sub>1-</sub>M<sub>5</sub>) no córtex orbitofrontal de pacientes com DA com psicose, utilizando radioligantes, relatou uma redução na densidade de ligação dos subtipos M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> (Tsang et al., 2008). Em contrapartida, investigações realizadas com toxinas seletivas radiomarcadas contra M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub>, relataram que os níveis de mAChRs pré-sinápticos podem ser diminuídos a partir da progressão do comprometimento cognitivo leve para a DA. Ou seja, essas alterações podem estar sujeitas a padrões gerais pré e pós-sinápticos de degeneração que ocorrem no processo de evolução da doença (Lebois et al., 2018; Mulugeta et al., 2003). Outras investigações relataram mudanças complexas nos níveis de receptores muscarínicos no SNC de indivíduos com DA, tendo demonstrado níveis mais baixos de receptores em áreas como o prosencéfalo basal, frontal inferior, cingulado e occipital (Colloby et al, 2015), e níveis mais elevados de receptores em áreas como o subículo, giro parahipocampal e córtex pré-frontal dorsolateral de indivíduos com o distúrbio (Scarr et al., 2017). Em adição, outras pesquisas não encontraram mudanças significativas nos níveis de mAChRs no SNC dos indivíduos com o distúrbio investigados (Wang et al.,
1992; Pakrasi et al., 2007). Essas divergências também podem ser resultantes de diferenças no manuseio das amostras, da metodologia de medição de ligação ao receptor, das diferentes regiões cerebrais estudadas e (Medeiros et al., 2011) do estágio da doença. Apesar do conflito entre os estudos, a maioria dos dados sugere que o sistema de receptores muscarínicos está prejudicado/alterado na fisiopatologia da doença de Alzheimer (Scarr, 2012; Levey, 1996). Nesse contexto, fica exposta a necessidade de mais pesquisas para compreender melhor o papel dos receptores muscarínicos no SNC de indivíduos com DA.

Estudos relataram que a ativação de receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs) está envolvida na ativação de diferentes vias de sinalização no SNC, sendo responsáveis por processos pós-traducionais de diversas proteínas (Ahmed et al., 2017). Testes *in vivo* (Welt et al., 2015) e *in vitro*, mostraram que a ativação do subtipo M<sub>1</sub>, em modelos animais de DA, podem modular o processamento de APP em direção a vias não amiloidogênicas, reduzir os níveis de beta amiloide (Davis et al., 2010), da proteína Tau, e melhorar o desempenho cognitivo (Caccamo et al., 2006). Além disso, ensaios clínicos de pacientes com DA também demonstraram que a ativação desse subtipo de receptor está associada à regeneração neural e à diminuição da concentração de  $\beta$ -amilóide (Verma et al., 2018). O uso dos diferentes subtipos de receptores muscarínicos como alvos para o tratamento da DA pode representar uma estratégia relevante no tratamento e no entendimento da complexidade da doença.

Diante desses fatos, fica evidente que o desenvolvimento de estratégias de tratamento eficazes em retardar ou prevenir a progressão da DA passará pelas intervenções colinérgicas. Dada a complexidade e heterogeneidade da fisiopatologia da doença, o uso de terapias combinadas direcionadas a múltiplos alvos vem sendo cogitada em diversos trabalhos, onde o uso de inibidores da AChE combinado com outras substâncias de diferentes propriedades como anti-amilóide, anti-tau, antioxidantes e imunoterapêuticas, representam uma alternativa importante para tratamento da DA (Korábečný et al., 2018; Hampel et al., 2018; Spilovska et al., 2017; Mishra et al., 2013).

## 1.8 Geleia Real

A geleia real (GR) é um composto viscoso derivado da secreção das glândulas hipofaringeanas (consistência aquosa) e mandibulares (consistência leitosa) das abelhas operárias da espécie Apis melífera (Mureşan et al., 2019). Na colmeia, durante a fase larval, a GR serve de alimento para todas as abelhas durante os primeiros dias de vida, após esse período, apenas a abelha rainha passa a ser alimentada com esse composto e isso se perpetua durante toda a sua vida (Fig.2). Em contra partida, as abelhas rainhas vivem por um período de até 5 anos enguanto as operárias (derivadas do mesmo genoma diploide) vivem em média 45 dias. Além disso, as abelhas rainha são maiores, se desenvolvem mais rapidamente e possuem um sistema para a reprodução (produção de ovos) muito eficiente. Isso mostra que a GR possui um papel essencial na regulação do desenvolvimento fisiológico, longevidade e diferenciação da sociedade das abelhas em castas (Page e Peng, 2001; Kamakura, 2011; Shorter et al., 2015). A GR é constituída por uma grande variedade de compostos que incluem: altas quantidades de ACh (Grünewald e Siefert, 2019), proteínas, açúcares, lipídios, vitaminas, aminoácidos, minerais, flavonóides, polifenóis, além de moléculas bioativas que atuam em processos de regeneração celular no organismo humano (Ting et al., 2014; Ramanathan et al., 2018).



Figura 2 – Larva Real mergulhada em geleia real. Fonte: (Ramos, 2007).

Desde a antiguidade, a GR é utilizada e reconhecida por apresentar diversos efeitos biológicos e terapêuticos (Kocot et al., 2018). Atualmente, diversos estudos têm mostrado que a GR possui uma série de atividades fisiológicas e farmacológicas que atuam na regulação de sistemas biológicos. A sua utilização tem mostrado enorme potencial terapêutico para inúmeras doenças e disfunções, por exemplo, no tratamento de doenças como diabetes, hipercolesterolemia (Khazaei et al., 2018; Maleki et al., 2019), ação anticâncer (Miyata et al., 2018), antioxidante (Liu et al., 2008; Gu H et al., 2018), cicatrizante (Siavash et al., 2011; Lin Y et al., 2019), neuroprotetora (Mohamed et al., 2015), além de outros efeitos.

Na complexa variedade de componentes quimicamente ativos que compõem a GR, o Ácido 10-Hidróxi-2-decenóico (10-HDA) (Fig.3), encontrado apenas na GR, representa o principal agente da fração lipídica e também o principal princípio ativo; é considerado comercialmente como um indicador de boa qualidade e autenticidade, ainda possui ação antimicrobiana, o que confere ao produto maior durabilidade (Fratini f et al., 2016; Zhao et al., 2016). Estudos demonstraram que o ácido 10-HDA também apresenta efeitos antioxidantes e neuroprotetores (Mohamed et al., 2015), efeitos benéficos na diminuição de sintomas de ansiedade e depressão em modelos murinos de estresse induzido (Ito et al., 2012), efeito antiinflamatório (Sugiyama et al., 2012), propriedades antienvelhecimento (Honda et al., 2015), e capacidade de induzir aumento do crescimento e da viabilidade de neurônios primários do hipocampo (Weiser et al., 2017). Outro importante composto bioativo e exclusivo da GR é o AMP N1-óxido, que segundo Teixeira e colaboradores (2017), apresenta efeitos antioxidantes e neuroprotetores identificados em um modelo de contenção e estresse pelo frio em ratos. Outros achados mostraram um efeito positivo dessa substância como facilitadora da astrogênese em células progenitoras em cultura (NSCs) a partir da ativação/fosforilação do STAT3, uma proteína transdutora de sinal que regula a expressão de genes específicos de astrócitos (Hattori et al., 2007). As MRJPs (major real jelly proteins), correspondem ao principal grupo de proteínas da GR (mais de 80% das glicoproteínas solúveis) (Drapeau et al., 2006), elas apresentam atividade imunomoduladora (Simuth et al., 2004), reguladora da atividade metabólica em síndromes metabólicas (Kashima et al., 2014), potencial efeito cicatrizante (Lin et al., 2019) e outras atividades. Além disso, peptídeos oriundos da hidrólise de proteínas da GR, através da protease N, mostraram forte atividade antioxidante (Guo et al., 2009). Se tratando de conteúdo proteico da GR, também vale salientar a Royalisin, um peptídeo de 5,5 kDa que também possui atividade antibacteriana (Bílikova et al., 2015).

Diante do cenário atual de carência de terapias eficientes contra a DA e outras doenças neurodegenerativas, e do aumento crescente da expectativa de vida global, torna-se urgente a necessidade do uso de novas ferramentas com potencial terapêutico (Lane et al., 2018).

Em estudo realizado anteriormente por nosso grupo, mostramos os efeitos benéficos da GR em funções cognitivas e sua ação neuroprotetora. Neste estudo, utilizamos o modelo da icv-STZ e mostramos que a GR foi capaz de induzir efeitos positivos na retenção da memória espacial operacional dos animais e de reduzir a neurodegeneração e o estresse oxidativo induzidos pelo icv-STZ (Silva, 2017; Silva et al., 2020).



Figura 3 – Fórmula estrutural do Ácido 10-Hidróxi-2-decenóico (10-HDA), um componente único da GR, não é encontrado em nenhuma outra matéria-prima natural e apresenta uma série de atividades farmacológicas. Fonte: (You et al., 2019).

No final de dezembro de 2019, foi relatado à Organização Mundial da Saúde (OMS) a ocorrência de um surto epidêmico viral desconhecido na cidade de Wuhan, província de Hubei, China (Zhu et al., 2020a; Huang et al., 2020). O surto se espalhou rapidamente e até 11 de novembro de 2020 já haviam sido divulgados mais de 51.251.907 casos e 1.270.930 mortes em mais de 216 países ou regiões em todo o globo (Guo e He, 2021). Atualmente este surto é classificado pela OMS como

pandemia de Covid-19, doença causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) (WHO., 2019; Zhu et al., 2020a).

Os desafios impostos à sociedade pela pandemia de Covid-19 revelaram a necessidade urgente do desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico rápido e protocolos de tratamento eficazes (Sreepadmanabh et al., 2020). Entretanto, não há tratamentos aprovados para pacientes com COVID-19 até o momento (Loannidis et al., 2020; Alsharif e Qurashi et al., 2021).

Investigações recentes concluíram que a suplementação nutricional pode desempenhar um papel de suporte em pacientes com COVID-19 resultando na redução da carga viral de SARS-CoV-2 e no tempo de hospitalização (Gombart et al., 2020; Calder et al., 2020; Shakoor et al., 2021).

Nesse cenário, e a partir do aprimoramento das ferramentas de pesquisa, tendo em vista os avanços recentes relacionados aos produtos apícolas, a apiterapia tem revelado ser uma fonte promissora de agentes farmacológicos e nutracêuticos (Nainu et al., 2021), incluindo atividade antiviral para o tratamento e/ou profilaxia da COVID-19 (Lima et al., 2021) e outras doenças virais (Nainu et al., 2021). Produtos das abelhas como mel, própolis e geleia real apresentam em sua composição compostos fenólicos que contribuem para muitas de suas propriedades funcionais, incluindo sua atividade antioxidante, antiviral, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatória, cicatrizante e cardioprotetora, entre outras (Cornara et al., 2017; Pasupuleti et al., 2017; Al Naggar et al., 2021).

No que se refere a GR, estudos recentes com as principais proteínas da GR (MRJPs; MRJPs 1–9) mostraram uma potente atividade antiviral contra hepatite C (HCV) e HIV (EL-Fiky et al., 2018; EL-Fiky et al., 2020; Habashy et al., 2019). Em adição, análises in sílico e de Docking molecular revelaram que a MRJP2 e sua isoforma X1 da GR são supostamente eficientes na supressão da replicação viral e podem aumentar a sensibilidade de células hospedeiras à imunidade inata para detecção viral após a entrada. Dessa forma, esses componentes poderiam prevenir complicações causadas pela infecção do SARS-CoV-2. No entanto, novas investigações, como testes *in vitro*, ainda são necessárias para confirmar esses mecanismos previstos (Habashy e Abu-Serie et al., 2020).

Evidências mostram que a coinfecção microbiana (fúngicas ou bacteriana) aumenta o risco de gravidade da doença COVID-19 em humanos (Zhu et al., 2020). Por outro lado, foi relatado na literatura que GR possui um potente efeito antibacteriano, principalmente contra bactérias Gram positivas (Fratini F et al., 2016) e antifúngico (Koç et al., 2010), além de efeitos positivos na estimulação/ativação de funções imunológicas (Babaei et al., 2016).

Nesse contexto, dado seu amplo espectro de efeitos biológicos apontados em pesquisas, a GR apresenta-se como uma ferramenta potencial e uma alternativa viável como agente modulador de mecanismos envolvidos no envelhecimento (como o estresse oxidativo), na longevidade e qualidade de vida (Kunugi et al., 2019). Além disso, pode ser útil como um produto em potencial para o tratamento e prevenção de coinfecções microbianas assim como um agente profilático para casos de COVID-19, além de outras síndromes respiratórias humanas. No entanto, mais estudos são necessários para examinar os mecanismos celulares e moleculares específicos dos constituintes da GR (MRJPs, 10-HDA, Royalisin, AMP N1-óxido, entre outros) que infelizmente não têm sido devidamente explorados.

# 2 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do consumo oral e prolongado da Geleia Real em ratos Wistar submetidos ao modelo icv-STZ através de avaliações comportamentais e neuroquímicas.

# 2.1 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do consumo por via oral da Geleia Real em ratos submetidos ao modelo icv-STZ por meio das seguintes abordagens:

- a) Avaliar a aprendizagem e memória espacial operacional utilizando o teste do labirinto quático de Morris;
- b) Avaliar a aprendizagem e memória de curta e longa duração utilizando o teste de reconhecimento de objeto novo;
- c) Analisar a atividade exploratória através do teste de campo aberto;
- d) Analisar a ativação das células glias; astrócitos e micróglia a partir da imunorreatividade para GFAP e IBA-1, respectivamente;
- e) Determinar os subtipos de receptores muscarínicos, por meio do estudo de imunoprecipitação com anticorpo que reconhece a região aminoterminal de cada um dos subtipos de receptores muscarínicos (M<sub>1</sub> a M<sub>5</sub>), em preparação de membrana solubilizada de hipocampo de ratos;

# **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, com 2 meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan com peso compreendido entre 220g e 240g. Os animais foram mantidos alojados em gaiolas de polietileno forradas com maravalha (1 animal por caixa) em condições padronizadas de temperatura (22 ± 2 °C). Foi respeitado um ciclo circadiano de 12 horas, claro-escuro (luz ligada às 7h). Os ratos tiveram livre acesso à comida e água e passaram por um período de 4 dias de adaptação ao ambiente antes da realização dos experimentos. Os procedimentos experimentais tiveram aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) e foram protocolados sob o número 1246250718.

## 3.2 Geleia Real

A geleia real (GR) foi utilizada na sua forma *in natura*. Foi utilizada uma dose diária de 200 mg/kg via oral (v.o) por gavagem durante 14 dias consecutivos a partir do sétimo dia após a cirurgia estereotáxica. Durante a fase de tratamento (período P3), os animais de todos os grupos permaneceram 6 horas em jejum (7h – 13h) antes de receberem a GR ou água destilada (grupo Controle). A GR foi obtida da empresa apícola "Estação do Mel" (Pindamonhangaba - SP, Brasil) e primeiramente mantida a -80°C e ao abrigo da luz. Posteriormente, foi fracionada e armazenada em tubos Eppendorfs em alíquotas de 350mg e mantida congelada a -20 °C.

# 3.3 Administração Intracerebroventricular de Estreptozotocina; Modelo Experimental da Doença de Alzheimer Esporádica

Para realizar o procedimento cirúrgico de injeção icv-STZ os animais foram primeiramente anestesiados com cetamina (130 mg/kg via intraperitoneal, i.p.) e xilasina (13 mg/kg i.p.), tendo em seguida a cabeça raspada e o crânio exposto e fixado no aparelho estereotáxico. As suturas ósseas cranianas foram expostas e o ponto Bregma serviu de referência para as coordenadas definidas a partir do atlas de

coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (1998). Foram feitos 2 pequenos orifícios com uma broca de baixa rotação para que a injeção icv bilateral pudesse ser realizada. As coordenadas definidas (ântero-posterior = -0,8 mm; medial-lateral = ± 1,5 mm e dorso-ventral = -3,8 mm) foram confirmadas com a realização de cortes histológicos do cérebro. A injeção icv bilateral foi feita diretamente nos ventrículos laterais com uma microsseringa Hamilton de 5,0 µl conectada ao aparelho estereotáxico. Foi administrado 3,0 mg/kg de estreptozotocina por animal (1,5 mg/kg por ventrículo). A solução de estreptozotocina foi preparada pela diluição da droga em solução Ringer 0,125 mg/ul (média de 3,0 ul de solução por ventrículo) imediatamente antes de seu uso. A injeção icv foi realizada em um fluxo de 1ul/min. Após a injeção, a agulha foi mantida por mais 2 minutos em cada ventrículo para evitar o refluxo da solução. Em seguida, a área da incisão foi limpa com soro fisiológico estéril e posteriormente suturada. Os animais do grupo Controle foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos e receberam injeção icv de solução Ringer. Após a cirurgia os animais passaram por um período de recuperação de 3 dias alojados em gaiolas individuais com comida e água a vontade.

## 3.4 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- a) Grupo Controle (CTR) Receberam solução Ringer (icv) e água destilada (v.o).
- b) Grupo Geleia Real (**GR**) Receberam solução Ringer (icv) e geleia real (v.o).
- c) Grupo Estreptozotocina (STZ) Receberam estreptozotocina (icv) e água destilada (v.o).
- d) Grupo Estreptozotocina / Geleia Real (STZ-GR) Receberam estreptozotocina (icv) e geleia real (v.o).

#### 3.5 Testes comportamentais

#### 3.5.1 Labirinto Aquático de Morris

Os testes de labirinto aquático de Morris foram realizados em um tanque circular de fundo e paredes pretas com 200 cm de diâmetro e 50 cm de altura, preenchida até 30 cm com água à temperatura de aproximadamente 25 °C (Morris,

1984). Uma plataforma de acrílico transparente de 10 cm de diâmetro, colocada a 2 cm abaixo da superfície da água, serviu de escape para os animais. A plataforma submersa permaneceu no mesmo local durante toda a sessão de um mesmo dia, mas a cada dia a plataforma foi mudada de localização/quadrante. A piscina foi dividida em 4 quadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4) de áreas iguais que se intersectam uma a outra ao longo de linhas imaginárias que cruzam a borda da piscina nos locais cardinais arbitrários de início (N,S,L,O). Estes foram marcados e usadas como referenciais para o experimentador (Fig.4). Após o animal ser introduzido na piscina, teve de aprender a chegar ao local da plataforma submersa em um período de até 2 minutos, tendo como referência visual as pistas externas fixadas nas paredes próximas ao labirinto. Após encontrar a plataforma submersa, o animal permaneceu sob a plataforma por 15 segundos para reconhecimento do ambiente. Os animais foram submetidos a 4 tentativas de localização da plataforma a cada dia. Quando o animal não encontrava a plataforma (submersa) na primeira tentativa da sessão do dia, ele era guiado até a plataforma e deixado lá por 15 segundos para o reconhecimento do ambiente, pois nessa 1° tentativa é natural/comum que o animal não encontre onde a plataforma se encontra. O intervalo de tempo entre as 4 tentativas (IET) foi de 5 minutos (IET = 5). Para a análise do aprendizado e memória espacial dos ratos foram utilizados os seguintes parâmetros: "Latência para Encontrar a Plataforma" (LAT), "Distância Percorrida" (DIST), e "Porcentagem de Tempo na Área do Contador" (%T-A\_CONT), a qual corresponde a uma área três vezes o diâmero da plataforma. O experimento foi registrado por uma câmera de vídeo conectada a um computador configurado com o software Maze HVS-Image (versão 2014) programado para analisar pares de coordenadas que definem a posição do animal coletadas a cada 0,1s. Todos os testes comportamentais foram realizados sempre no período vespertino, entre 14:00 e 18:00 h.

Os resultados coletados nos testes foram separados e analisados separadamente em 3 períodos distintos (Fig. 5). <u>Período P1</u> (no qual os animais não receberam nenhum tratamento): Compreende os quatro primeiros dias de testes (S1 à S4), que antecedem a cirurgia icv-STZ. Neste período foi realizada a fase de aprendizado. <u>Período P2</u>: Foi avaliado o efeito da injeção icv-STZ no desempenho de aprendizado e memória espacial operacional dos animais através de duas sessões de testes (S5 e S6) nos dias 4 e 6 da linha do tempo. <u>Período P3</u>: Foi analisado os efeitos da injeção icv-STZ e o efeito do tratamento oral com a geleia real no desempenho do

aprendizado e memória espacial dos animais nos dias 11, 13, 16, 18 e 20 (total de 5 sessões, S7 à S11), da linha do tempo, após a cirurgia. Durante todas as sessões realizadas (S1 à S11) os animais realizaram 4 tentativas (T1 à T4) de localização da plataforma em cada sessão.



Figura 4 – Esquema representativo do teste labirinto aquático de Morris. Fonte: (Wu P et al., 2016).

#### 3.5.2 Teste Campo Aberto (CA)

O teste de Campo Aberto foi realizado para avaliar a atividade exploratória e locomotora dos animais. A partir deste teste é possível analisar respostas comportamentais como atividade locomotora, hiperatividade, hipoatividade e comportamento exploratório (Dagan et al., 2016). Os animais foram colocados no centro da arena do Campo Aberto, e individualmente, foram observados por um período de 5 minutos. Entre as observações de cada animal, a arena foi limpa com uma solução de álcool 5% para evitar que o cheiro e resíduos dos outros animais influenciassem no resultado. O aparato em que foi feito o experimento possui um formato circular com uma área de 98 cm de diâmetro cercado por paredes de 45 cm de altura (para evitar a fuga dos animais) sendo o piso pintado de branco e demarcado com linhas pretas que formam círculos concêntricos e retas segmentadas; por meio dessas marcações foi possível fazer a quantificação da atividade locomotora dos sujeitos. Os parâmetros comportamentais abordados como indicativo da atividade

geral dos ratos foram: frequência de locomoção, frequência de levantar, tempo de limpeza e tempo de parado. O ato de o animal se locomover, penetrando com as 4 patas em uma das divisões do chão da arena foi registrado como uma unidade de locomoção. A unidade de levantar corresponde a postura do animal, ao permanecer apoiado somente nas patas posteriores e com o tronco perpendicular ao chão da arena, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores as paredes do campo aberto. O parâmetro parado foi avaliado como período de tempo (em segundos) em que o animal não apresentou nenhuma atividade motora, permanecendo estático no que diz respeito a cabeça, tronco e membros. O tempo de limpeza foi avaliado de acordo com o período em que o animal executou movimentos nas patas anteriores para trás dos pavilhões auriculares com movimentos de lamber dirigidos principalmente as porções laterais do corpo e da genital. Esse teste foi feito no 13° dia após a cirurgia icv-STZ, dentro do período denominado P3 na linha do tempo do elineamento experimental (Fig.5).

#### 3.5.3 Reconhecimento de Objetos (RO)

O Teste de reconhecimento de objetos (RO) investiga alterações na memória de curto e longo prazo dos roedores; consiste em analisar o comportamento natural dos ratos em explorar objetos novos em detrimento de objetos antigos, baseando-se no instinto exploratório inato dos roedores em explorar a novidade para o aprendizado do ambiente (Ennaceur e Delacour, 1988). O experimento foi realizado no mesmo aparato onde é feito o Teste de Campo Aberto. O teste de RO é composto de três fases: fase de habituação, fase de amostragem e fase de teste. Inicialmente, antes de qualquer procedimento (fase de habituação), os animais foram colocados, individualmente, na arena de campo aberto vazia e permitidos a explorar o ambiente (para reduzir o medo do desconhecido), durante 10 min, por 3 vezes, com intervalos de 30 minutos entre as habituações, sendo posteriormente levados para sua caixa moradia. Durante a fase de amostragem (24 horas após), os animais foram colocados novamente na arena que continha dois objetos idênticos denominados A1 e A2, alinhados ao centro e a uma distância de 20 cm das paredes laterais. Foi permitido aos animais explorar o ambiente e os objetos durante 10 minutos e o tempo de exploração de cada objeto foi cronometrado. Durante a fase de teste (1 hora após a fase de habituação), um dos objetos (A2) foi trocado por um objeto novo, denominado objeto B, os animais foram então recolocados na arena e permitidos a explorar por 5 minutos e em seguida levados para suas caixas moradia. Após 24 horas (segunda etapa da fase teste), para avaliar a memória de longo prazo esse procedimento foi repetido, havendo a substituição do objeto B por outro objeto (novo), denominado objeto C. O tempo de exploração de cada objeto foi cronometrado e a arena e os objetos foram limpos com álcool 5% entre os testes. Foi considerado como exploração dos objetos, o ato de cheirar, tocar o objeto com a pata dianteira, lamber, morder ou aproximar o nariz a uma distância  $\leq$  1 cm. A preferência pelo objeto novo foi calculada pela razão entre o tempo gasto explorando o objetos (T-total) caracterizado como Índice de Discriminação (DI = T-novo / T-total). Esse experimento foi realizado nos dias 13, 14 e 15 após a cirurgia icv-STZ (Fig. 5).

# 3.6 Ensaios de imunohistoquímica para avaliação da atividade de astrócitos e micróglia em hipocampo de ratos

No final do cronograma experimental, após os testes comportamentais (21° dia após as cirurgias estereotáxicas), os animais foram submetidos às análises histológicas. Primeiramente foram anestesiados com cetamina (130 mg/kg via intraperitoneal, i.p.) e xilasina (13 mg/kg i.p.), após, perfundidos intracardiamente no ventrículo esquerdo (com auxílio de uma bomba de perfusão contínua) com 300 ml de tampão fostato salina (PBS – phosphate buffered saline) 0.1M, pH 7,4, seguido por 300 mL de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB – sodium phosphate buffer) 0,1 M, pH 7,4. Os cérebros foram removidos do crânio, pós-fixados em paraformaldeído a 4% por 4h a 4°C e crioprotegidos com solução de sacarose 30%, por mais de 48 horas (sob temperatura de 4 °C) até a realização dos cortes. Os tecidos foram cortados (espessura de 30 µm) em gelo seco usando um micrótomo deslizante de congelamento. Os cortes coronais sequenciais foram colocados em placas de cultivo, em solução crioprotetora e armazenados a 4 °C até o momento do procedimento de imuno-histoquímica. Para a imunomarcação as regiões CA1, CA3, HL, GD do hipocampo foram submetidos à metodologia de peroxidase com anticorpos específicos de interesse do estudo, dentre eles: Iba1 (Abcam, ab5076) e GFAP (Sigma Aldrich, g3893). Os cortes foram lavados em tampão PB por três vezes de 10 minutos e incubados com os anticorpos primários descritos acima em PB com 0,3% de triton x-100 e 5% de soro normal em que foi produzido o anticorpo secundário. Após um período de 14 a 18 horas à temperatura ambiente, os cortes foram novamente lavados em tampão PB e incubados por duas horas com anticorpo secundário biotinilado. Após uma nova série de lavagens, os cortes foram incubados por mais duas horas com o complexo avidina-biotina-peroxidase, numa solução de triton x-100 0,3 % em PB 0,1M com 0,4 M de NaCl. Após nova série de lavagens com PB, os cortes foram pré-incubados em solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e tampão PB 0,1M, durante 3 minutos sob agitação. Posteriormente, ainda sob agitação, foi adicionado gradualmente, em gotas, 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>0,3% (100 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% em 10mL de H<sub>2</sub>O destilada) utilizando uma pipeta plástica descartável, até que fosse possível visualizar a marcação marrom nos tecidos. Após a reação ser revelada, os cortes foram lavados em PB, montados em lâminas gelatinizadas e deixados secar em estufa de secagem e posteriormente desidratados em soluções de concentração crescente de etanol, clarificados em xilol e cobertas com lamínulas tendo como meio de montagem permount. A quantificação do número de células e a quantificação por densitometria foram analisadas em cortes imunocorados. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio óptico (DMIRB, Leica) acoplado a uma câmera digital (DXM 1200C, Nikon). Foram obtidas com objetiva de 10x. A análise automatizada das imagens foi processada com o software Image J® 1,49v (Schneider et al., 2012). Os parâmetros usados para capturar as imagens digitais foram mantidos constantes. Cada imagem foi aberta e convertida para o formato de 8 bits; uma porção do hipocampo de interesse dentro da imagem foi delineada. A imunocoloração foi avaliada em áreas de 0,04 mm2 para HL, CA3, CA1 e 0,05 mm2 para GD. As contagens de células foram realizadas em 6 (Iba1) e 10 (GFAP) seções do cérebro de cada animal (hemisfério direito ou esquerdo).

# 3.7 Ensaios de Imunoprecipitação para detecção dos subtipos de receptores muscarínicos (M<sub>1</sub> a M<sub>5</sub>)

#### 3.7.1 Drogas e Reagentes

Atropina (antagonista muscarínico não seletivo), deoxicolato de sódio, digitonina, albumina bovina (fração V), sacarose, PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), TRIZMA-base (tris[hydroxymethyl]amino-methane), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), procedentes da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Reagente de Bradford, procedente da Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Pansorbin, procedente da Calbiochem (La Jolla, Ca, USA) e álcool etílico absoluto e sacarose, procedentes da Synth Produtos para Laboratório LTDA (Diadema, SP, Brasil).

## 3.7.2 Anticorpos

Anticorpos primários policlonais, produzidos em cabra, contra a região aminoterminal dos receptores muscarinicos, M1 (C-20): Sc-7470; M2 (C-18): Sc-7472; M3 (C-20): Sc-7474; M4 (C-19): Sc-7476 e M5 (C-20): Sc-7478, procedentes da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Anticorpo secundário procedentes da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

#### 3.7.3 Substâncias radioativas

[<sup>3</sup>H]Quinuclidynil benzilate, L-[benzilic-4,4'-<sup>3</sup>H(N)]- ([<sup>3</sup>H]QNB), atividade específica 47,4 Ci/mmol, procedente da PerkinElmer (Boston, MA, USA).

## 3.7.4 Tampão Tris HCI para ensaios com radioligantes

Foi utilizado o tampão Tris-HCl, com a seguinte composição (mM): TRIZMAbase 25, MgCl<sub>2</sub> 5; EDTA 1,0; PMSF 1 e sacarose 300.

Foi preparada a solução (exceto sacarose e PMSF) e conservada à 4°C. No momento do uso, foram acrescentados a sacarose e o PMSF. O pH do tampão variou

entre 7,4 e 7,5. As soluções tampões usadas nos experimentos foram preparadas em água destilada e filtrada em sistema Milli Q (Milli Q Plus, Millipore). A solução estoque de PMSF (0,1 M) foi preparada com etanol absoluto e conservado a -20°C por até 30 dias.

#### 3.7.5 Outros materiais

Líquido de cintilação Optiphase Hifase 3, procedente da Perking Elmer (Loughborough, Leics, UK).

Filtro de fibra de vidro GF/B, procedente da Whatman (Maidstone, England).

#### 3.7.6 Isolamento do hipocampo de ratos

Animais dos diferentes grupos experimentais foram pesados e anestesiados com solução de cloridrato de cetamina (130 mg/kg i.p.) e cloridrato de xilazina (13 mg/kg i.p). Após abertura da caixa craniana do animal o cérebro foi exposto e foi realizada a dissecção do hipocampo. Este foi retirado e lavado com tampão Tris-HCl 25mM, (contendo sacarose 0,3 M, MgCl<sub>2</sub> 2 5 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM).

## 3.7.7 Preparação de membrana semipurificada de hipocampo

O hipocampo (obtido de 4-5 animais) foi homogeneizado no tampão Tris-HCl 25 mM (contendo sacarose 0,3 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM), empregando-se homogenizador "Ultra-Turrax" a 9.500 rpm, 2 vezes, 30 segundos. O homogenato foi centrifugado a 1.000 x g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi separado e filtrado em camada dupla de gaze. O precipitado foi ressuspendido no mesmo tampão, novamente homogeneizado, centrifugado e filtrado nas mesmas condições anteriormente descritas. O conjunto dos sobrenadantes foi centrifugado a 100.000 x g durante 60 minutos (Cardoso et al., 2004). O precipitado foi ressuspendido em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM com o auxílio de um homogeneizador "Dounce" (Abdalla et al., 2004). Todo o processo de obtenção da membrana foi desenvolvido a 4°C e a estocagem da preparação foi a -80°C.

A concentração de proteína foi determinada (Bradford, 1976), em alíquotas das suspensões de membranas do hipocampo.

# 3.7.8 Detecção dos subtipos de receptores muscarínicos (M1 - M5)

Os experimentos foram realizados segundo o método descrito por Shiozaki e colaboradores (1999), com algumas modificações (Cardoso et al., 2010):

# 3.7.9 Determinação da ligação específica do [<sup>3</sup>H]Quinuclidynil benzilate ([<sup>3</sup>H]QNB) em preparação de membrana semipurificada de ratos controle (CTR)

As preparações de membrana semipurificada de hipocampo de animais controle (100 µg proteína), em duplicata, foram incubadas por 60 minutos a 30°C em tampão Tris-HCl 25 mM (contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM) com 1,5 nM de [<sup>3</sup>H]QNB (ligação máxima obtida nos ensaios de saturação) (Silva et al., 2019), na presença (ligação inespecífica) e na ausência (ligação total) de atropina 1 µM, em volume final de 500 µL, seguida de rápida filtração em filtro Whatman GF/B. Os filtros foram lavados 3 vezes com 1 ml de PBS gelado e transferidos para frascos contendo 5 ml de líquido de cintilação. A radioatividade foi determinada, por 2 minutos cada amostra, em contador  $\beta$  (LS 6500 IC, Beckman). A ligação específica (ligação total - ligação inespecífica) do [<sup>3</sup>H]QNB foi determinada. O resultado foi expresso em fmol/mg de proteína.

# 3.7.10 Solubilização do complexo [<sup>3</sup>H]QNB-receptor e determinação da ligação específica

As preparações de membrana semipurificada de hipocampo de animais dos diferentes grupos experimentais (100  $\mu$ g proteína), em duplicata, foram incubadas por 60 minutos a 30°C em tampão Tris-HCl 25 mM (contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM) com 1,5 nM de [<sup>3</sup>H]QNB na presença (ligação inespecífica) e na ausência (ligação total) de atropina 1  $\mu$ M, em volume final de 500  $\mu$ L. Após esse período, as amostras foram lavadas com 500  $\mu$ L de Tris-HCl 25 mM, (contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM e deoxicolato de sódio 0,1 %) e incubadas no mesmo

tampão, por 1 hora a 4°C. A seguir, o receptor muscarínico foi solubilizado usando Tris-HCl 25 mM (contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, digitonina 0,1% e deoxicolato de sódio 0,1 %) por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação (15.000 x g, 20 minutos, 4°C) o sobrenadante, contendo o receptor solubilizado, foi filtrado (filtro GF/B) e, a seguir, transferido para frasco contendo 5 mL de líquido de cintilação. A radioatividade e a ligação específica foram determinadas como descrito anteriormente no item 3.7.9.

# 3.7.11 Imunoprecipitação dos subtipos de receptores muscarínicos

As preparações de membrana semipurificada de hipocampo de animais dos diferentes grupos experimentais (100 µg proteína), em duplicata, foram incubadas por 60 minutos a 30°C em tampão Tris-HCl 25 mM (contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM) com 1,5 nM de [<sup>3</sup>H]QNB, em volume final de 500 µL. Após esse período, as amostras foram lavadas com 500 µL de Tris-HCl 25 mM, (contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM e deoxicolato de sódio 0,1 %) e incubadas no mesmo tampão, por 1 hora a 4ºC. A seguir, o receptor muscarínico foi solubilizado usando Tris-HCl 25 mM (contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, digitonina 0,1% e deoxicolato de sódio 0,1 %) por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação (15.000 x g, 20 minutos, 4°C), 100 µL do sobrenadante, contendo o receptor solubilizado, 100 µL das amostras, em duplicata, proveniente dos diferentes grupos experimentais foram incubadas por 4 horas a 4°C com 0,5 µg de anticorpo primário policional que reconhece a região aminoterminal de cada um dos subtipos dos receptores muscarínicos M1 a M5 (Santa Cruz Biotechnology) (ligação total) ou com IgG (ligação inespecífica), em Tris-HCl 25 mM (contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, digitonina 0,1% e deoxicolato de sódio 0,1%). Após este período, foi adicionado às amostras 20 mL de pansorbin e, novamente, incubadas sob agitação por 1 hora a 4ºC. A amostra foi centrifugada (15.000 x g, 10 minutos, 4°C). O precipitado foi lavado 2 vezes com 200 µL de Tris-HCl 25 mM, (contendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM), e novamente centrifugado na mesma condição anteriormente descrita. Alíquotas de 50 µL do sobrenadante ([<sup>3</sup>H]QNB-receptores muscarínicos não precipitado pelo pansorbin) e do precipitado (pansorbin + [<sup>3</sup>H]QNB-cada subtipo de receptores muscarínicos, imunoprecipitação total) ou pansorbin + [<sup>3</sup>H]QNB-lgG, imunoprecipitação inespecífica) foram transferidas para frasco contendo 5 mL de liquido de cintilação e a radioatividade determinada em contador β.

A imunoprecipitação específica (imunoprecipitação total - imunoprecipitação inespecífica) foi determinada e expressa em fmol/mg de proteína.

No hipocampo dos animais controle (CTR), o percentual de imunoprecipitado de cada subtipo de receptor foi também calculado dividindo os valores obtidos no precipitado pelos obtidos no sobrenadante + precipitado (Shiozaki et al., 1999).

# 3.8 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos em todos os testes, foi realizada utilizando o software GraphPadPrism v5. Para a análise estatística de dados obtidos no teste do Labirinto aquático de Morris, Reconhecimento de Objetos e as Análises Histológicas de Imuno-histoquímica, foi usado a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. Foi usado a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para a análise do teste de Campo Aberto. Os dados obtidos nos testes de Imunoprecipitação foram analisados por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão (S.E.M). O nível de significância foi fixado em 5% (p<0,05).

# 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos experimentais apresentados nos protocolos dos testes comportamentais, nas análises histológicas e na imunopreciptação foram utilizados em todos os grupos. Todos os experimentos foram realizados de forma padronizada, respeitando o período/dia estabelecido na linha do tempo do delineamento experimental (Figura 5) e os horários estabelecidos nos materiais e métodos.



## Legenda:

ICV	Procedimento cirúrgico ICV de Estreptozotocina ou Solução Ringer
GR	Administração oral de Geleia Real ou Água Destilada
LAM	Teste do Labirinto Aquático de Morris - Memória Operacional
CA	Teste Campo Aberto
RO	Teste de Reconhecimento de Objeto
IMUNO	Neuroinflamação avaliada pela Glia Reativa
EXP/REC	Análise da Expressão dos receptores Muscarínicos
EUT	Eutanásia dos animais

## Figura 5 – Esquema representativo do Delineamento Experimental

#### 5 RESULTADOS

# 5.1 Avaliação do aprendizado e memória espacial no labirinto aquático de Morris em ratos – Período P1

No Período P1 mostramos os resultados referentes ao treinamento feito no período pré-injeção icv-STZ, ou seja, quando os ratos já tinham sido distribuídos em diferentes grupos, mas ainda não tinham recebido qualquer tratamento. Os resultados de aprendizado e memória avaliados pelo teste do labirinto aquático de Morris, na versão memória operacional, apresentados na Tabela 1, evidenciam os dados dos seguintes parâmetros: Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (a qual corresponde a uma área de três vezes o diâmero da plataforma) (%T-A\_CONT). Demonstraram haver significância estatística para o fator tentativa [F(3,636) = 12,60-41,38;p<0,0001] e ausência de efeito significante para o fator Grupo [F(3,636) = 0,5565-3,194];p<0,6435]. O efeito significante para o fator Tentativa mostra que os animais apresentaram uma melhora no aprendizado ao longo das Tentativas e a inexistência de efeito para o fator Grupo mostra que todos os grupos apresentaram desempenho semelhante. Esse resultado revela que antes da cirurgia icv-STZ e do tratamento oral com a GR os animais estavam nas mesmas condições experimentais para a realização dos testes. Ao observarmos os gráficos do período P1 (Fig. 6), é possível notar que todos os grupos apresentaram curva de aprendizado semelhante, indicando que os sujeitos aprenderam a tarefa e melhoraram o seu desempenho ao longo das tentativas realizadas. O fator de significância em relação a tentativa 1 (T1), ocorreu porque nessa primeira tentativa os animais (de ambos os grupos) ainda não sabiam onde a plataforma se encontrava. No decorrer das tentativas seguintes (T2, T3 e T4), os animais apresentaram um aprendizado progressivo em relação à localização da plataforma. Dessa forma, o desempenho dos animais foi apresentado como T4>T3>T2>T1 (Figura 6). Vale ressaltar que neste período, apesar dos animais já estarem divididos em 4 grupos, nenhum deles recebeu qualquer tratamento com STZ, solução de Ringer ou GR. A divisão/nomeação dos grupos em CTR, GR, STZ e STZ-GR nessa fase é apenas prospectiva, feita para otimizar o cronograma.

**Tabela 1** – Memória operacional espacial avaliada pelo teste de labirinto aquático de Morris no período P1 (pré-cirúrgico) com intervalo de 5 min entre as tentativas – IET5

PARÂMETRO	GRUPO	TENTATIVA			TENTATIVA / GRUPO		
	F 3,636	Р	F 3,636	Р	F 3,636	Р	
LAT	0,5565	0,6435	41,38	< 0,0001	0,7448	0,6678	
DIST	3,194	0,0287	12,60	< 0,0001	0,5959	0,8007	
%T-A_CONT	2,119	0,1091	27,35	< 0,0001	0,6170	0,7829	



Figura 6 – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das tentativas no teste Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P1 (pré-cirúrgico, dias -4, -3, -2, -1) com intervalo entre tentativas de 5 min (IET5). CTR (n=10); GR (n=10); STZ (n=10); STZ-GR (n=10). CTR=Controle; **GR**=Geleia Real: STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina-Geleia Real. Valores representados pela média obtida em quatro 4 sessões de testes. Os dados foram analisados tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S1 a S4) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos. Dados expressos como média ± SEM. Significativamente diferente de T1 (p<0,05, ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni). Os animais não receberam qualquer tratamento. A nomeação dos grupos em CTR, GR, STZ e STZ-GR nessa fase é apenas prospectiva, feita para otimizar o cronograma.

# 5.2 Avaliação do aprendizado e memória espacial no labirinto aquático de Morris em ratos injetados icv-STZ – Período P2

Os resultados apresentados no período P2 mostram os efeitos da injeção icv-STZ (grupo STZ e STZ-GR) da injeção icv de solução Ringer (grupo CTR e GR) no aprendizado e memória espacial operacional dos animais (4º e 6º dia do cronograma experimental). Vale ressaltar, que nesta fase do teste investigamos apenas os efeitos da icv-STZ, e que o tratamento oral com GR só foi iniciado no Período P3, a partir do 7°dia após a cirurgia. Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que nos parâmetros Latência para Encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A\_CONT), houve diferença significante para o fator Grupo [F(3,316) = 8,861-160,0; p<0,0001], e também para o fator tentativa [F(3,316) = 6,141-13,74; p<0,0001]. O efeito significante para o fator Tentativa indica que os animais dos grupos CTR e GR, aprenderam a tarefa e memorizaram o local da plataforma ao longo das tentativas. O efeito significante para o fator Grupo revela que houve diferença de aprendizado entre os grupos controle (CTR), Geleia Real (GR) e aqueles tratados com icv-STZ (STZ e STZ-GR). Os dados obtidos foram analisados por ANOVA e demonstraram que a lesão causada por icv-STZ (grupo STZ e STZ-GR) induziu prejuízos de aprendizado e memória, evidenciado pelo mal desempenho dos animais quando comparados aos grupos CTR e GR (p<0,05) (Fig. 7). Este resultado pode ser observado tanto no decorrer das 4 tentativas de um mesmo dia (sessão) como ao longo dos dias de observação pós cirurgia.

Tabela 2 – Memória operacional espacial avaliada pelo teste de labirinto aquático de	Э
Morris no 4° e 6° dia após a injeção icv-STZ ou solução controle com intervalo de 5	
min entre as tentativas (Período P2 – IET5).	

PARÂMETRO	GRUPO	TENTATIVA			TENTATIVA / GRUPO		
	E 2 246	D	E 2 246	D	E 2 246	D	
	г 3,310	P	г 3,310	P	г 3,310	r	
LAT	160,0	< 0,0001	13,74	< 0,0001	6,225	< 0,0001	
DIST	24,82	< 0,0001	6,141	< 0,0009	0,2349	0,9891	
%T-A_CONT	8,861	< 0,0001	13,33	< 0,0001	3,081	< 0,0017	



**Figura 7** – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P2 (dias 4 e 6) com intervalo entre tentativas de 5 min (IET5). CTR (n=10); GR (n=10); STZ (n=10); STZ-GR (n=10). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em duas sessões de testes. Os dados foram analisados tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores SESSÃO (S5 a S6) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos. Dados expressos como média ± SEM. Valores indicados por diferentes letras (a e b) diferem significativamente entre si, em relação ao fator GRUPO. # Significativamente diferente do grupo CTR e GR em relação ao fator TENTATIVA. Valores apontados pelos símbolos (\*) e (&) diferem significativamente do grupo GR e CTR respectivamente, em relação ao fator TENTATIVA (p<0,05, ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni). Nesta fase, foi avaliado apenas os efeitos da injeção icv-STZ.

# 5.3 Avaliação do aprendizado e memória espacial no labirinto aquático de Morris em ratos injetados icv-STZ e tratados com geleia real – Período P3

Os dados obtidos e analisados no Período P3 representam os efeitos da injeção icv-STZ e da administração oral e prolongada de geleia real sobre o desempenho dos animais nas tarefas de memória operacional do labirinto aquático de Morris. Os resultados apresentados na Tabela 3, representam os dados dos seguintes parâmetros: Latência para encontrar a Plataforma (LAT), Distância Percorrida (DIST) e Porcentagem de Tempo na Área do Contador (%T-A\_CONT). Esses dados expressam a existência de efeito significante para o fator Grupo [F(3,736) = 33,86-333,2; p<0,0001], e para o fator Tentativa [F(3,736) = 9,515-51,74; p<0,0001]. Os resultados na Tabela 3 mostram significância estatística nas tentativas T2, T3 e T4 do parâmetro Latência (LAT) para o grupo STZ-GR em relação ao grupo STZ, isso indica que os animais aprenderam a tarefa e memorizaram o local onde estava localizada a plataforma ao longo das tentativas. O efeito significante para o fator Grupo, mostra que houve diferença de aprendizado entre os grupos. O pós-teste de Bonferroni mostra que os animais dos grupos que receberam injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) apresentaram prejuízos de aprendizado e memória quando comparados aos animais dos grupos que receberam injeção de solução de Ringer (CTR e GR) e que, além disso, o tratamento oral com GR foi capaz de melhorar o desempenho dos animais (p<0,05) (Fig. 8).

PARÂMETRO	GRUPO	TENTATIVA TENTATIVA / GRUP				/ GRUPO
	F 3,736	Р	F 3,736	Р	F 3,736	Р
LAT	333,2	< 0,0001	45,72	< 0,0001	7,257	< 0,0001
DIST	33,86	< 0,0001	9,515	< 0,0001	0,7383	0,6738
%T-A_CONT	35,48	< 0,0001	51,74	< 0,0001	8,446	< 0,0001

Tabela 3 – Resultados	do Teste	e de Memória	no Período P3	- IET5
-----------------------	----------	--------------	---------------	--------



#### **TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS - PERÍODO P3**

**Figura 8** – Avaliação do desempenho dos animais ao longo das tentativas no teste de Labirinto Aquático de Morris em diferentes parâmetros da memória operacional espacial no Período P3 (do 7° ao 20° dia) com intervalo entre tentativas de 5 min (IET5). CTR (n=10); GR (n=10); STZ (n=10); STZ-GR (n=10). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Valores representados pela média obtida em cinco 5 sessões de testes. Os dados foram analisados tendo o fator GRUPO (CTR, GR, STZ e STZ-GR) como fator entre-sujeitos, e os fatores0 SESSÃO (S7 a S11) e TENTATIVA (T1 a T4) como fatores intra-sujeitos. Valores indicados por diferentes letras (a,b,c) diferem significativamente entre si, em relação ao fator GRUPO. • Significativamente diferente do grupo CTR, GR e STZ-GR em relação ao fator TENTATIVA. # Significativamente diferente do grupo CTR e GR em relação ao fator TENTATIVA. \* Significativamente diferente do grupo GR em relação ao fator TENTATIVA (p<0,05, ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni).

# 5.4 Avaliação da atividade exploratória no Teste de Campo Aberto em ratos injetados icv-STZ e tratados com geleia real

A Análise de Variância ANOVA mostra que não houve diferença significante entre os diferentes grupos referente aos diferentes parâmetros avaliados no teste de Campo Aberto. Os parâmetros analisados foram: Frequência de Locomoção: CTR (70,0±4,97), GR (75,0±2,98), STZ (67,5±5,38), STZ-GR (85,0±3,05). Frequência de Levantar: CTR (24,0±1,44), GR (23,5±2,56), STZ (22,0±3,02), STZ-GR (22,0±2,62). Tempo de Limpeza: CTR (10,0±3,05) GR (18,5±3,87), STZ (17,0±1,55), STZ-GR (12,0±2,88). Tempo Parado: CTR (0,1±1,62), GR (0,1±1,80), STZ (3,0±1,37), STZ-GR (0,1±1,73). Os resultados mostram que tanto a injeção icv-STZ como o tratamento prolongado com a geleia real não alteraram a atividade geral dos animais nos parâmetros analisados de frequência de Locomoção e Levantar, tempo de Limpeza e parado (p>0,05, ANOVA, teste de Tukey) (Fig. 9).



**Figura 9** – Efeitos da injeção icv-STZ e do tratamento prolongado com Geleia Real sobre a atividade exploratória dos animais observados em Campo Aberto e medido pela frequência de locomoção e levantar, tempo de limpeza e parado. CTR (n=10); GR (n=10); STZ (n=10); STZ-GR (n=10). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR= Estreptozotocina-Geleia Real. Dados expressos como média ± erro padrão. Valores não diferiram entre si (P>0,05, ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey).

# 5.5 Avaliação da memória de curta e longa duração a partir do Teste de Reconhecimento de Objetos em ratos injetados icv-STZ e tratados com geleia real

Os resultados apresentados no Teste de Reconhecimento de Objeto, conforme ANOVA, demonstraram que os animais do grupo STZ ( $12,00 \pm 0,90$ ) exploraram o objeto novo por um período de tempo menor do que o objeto familiar, quando comparados com os outros grupos CTR ( $30,5 \pm 4,5$ ) e GR ( $24,0 \pm 3,31$ ), após um período de tempo de 1 hora e 24 horas, 14 e 15 dias após a lesão da cirurgia icv-STZ e sete dias após o início do tratamento com a GR. Não houve diferença significante no tempo de exploração dos objetos novos pelos animais do grupo STZ-GR ( $17,5 \pm 1,77$ ), após um período de 1 hora e 24 horas, quando comparados com os grupos CTR, GR e STZ.



**Figura 10** – Avaliação da memória de curto e longo prazo dos animais, utilizando o teste de Reconhecimento de Objetos, 1 hora e 24 horas após a fase de amostragem, 14 dias após a cirurgia estereotáxica. CTR (n=10); GR (n=10); STZ (n=10); STZ-GR (n=10). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina–Geleia Real. Os dados foram expressos como média ± SEM. Valores indicados por diferentes letras (a e b) diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Bonferroni).

# 5.6 Avaliação da Imuno-Histoquímica em ratos injetados icv-STZ e tratados com geleia real

#### 5.6.1 Imunorreatividade para GFAP – Giro Denteado

As análises imuno-histoquímicas da expressão astrocitária de GFAP foram realizadas para avaliar a astrogliose reativa em diferentes áreas do hipocampo dos animais após 21 dias da injeção icv-STZ e o tratamento oral e prolongado com a Geleia Real no marcador glial, GFAP.

Todos os animais lesionados com a injeção icv-STZ (grupo STZ) e que não foram tratados com a GR (grupo STZ-GR), apresentaram um aumento na expressão de GFAP quando comparados com os grupos CTR e GR, indicando a existência de efeito significante para o fator lesão.

Os dados analisados na Figura11 mostram que segundo ANOVA, houve aumento da imunorreatividade para GFAP na região do Giro Denteado (GD) do hipocampo nos animais do grupo STZ, quando comparados com os outros grupos; houve aumento no número de células marcadas e na intensidade óptica das marcações. Os animais do grupo STZ-GR apresentaram uma redução na marcação do número de células GFAP positivas e na análise de intensidade óptica das marcações quando comparado com o grupo STZ, indicando efeito significante para o fator tratamento. Os grupos CTR, GR e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes em nenhum dos parâmetros de quantificação utilizados quando comparados entre si.

100um





**Figura 11** – (A) Fotomicrografias digitais representativas de cortes coronais do hipocampo de rato ilustrando a marcação de células GFAP positivas no Giro Denteado (GD), 21 dias após a injeção icv-STZ (STZ e STZ-GR) ou solução Ringer (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra de marcação). (B) Quantificação da Imunorreatividade para GFAP (astrócitos GFAP-positivos) no GD do hipocampo. (C) Intensidade óptica das marcações dos astrócitos imunorreativos no GD do hipocampo. CTR (n=3); GR (n=5); STZ (n=5); STZ-GR (n=5). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Dados expressos como média ± SEM. Escala=100 µm, objetiva 10x. Valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Bonferroni).

#### 5.6.2 Imunorreatividade para GFAP – Hilo do Giro Denteado

Foi observado, que os animais lesionados com icv-STZ apresentaram, conforme ANOVA, um aumento da resposta astrocitária no Hilo, quando comparados com os outros grupos, indicando a existência de efeito significante para o fator lesão. Os animais do grupo STZ-GR apresentaram uma redução no número de células marcadas no Hilo quando comparado com o grupo STZ, indicando uma redução da imunorreatividade para GFAP e a existência de efeito significante para o fator tratamento.

A análise de densidade óptica das marcações, revelou, conforme ANOVA, que os animais do grupo STZ apresentaram um aumento expressivo na intensidade óptica das marcações quando comparados com outros grupos, indicando efeito significante para o fator lesão. Foi observada, uma redução da intensidade óptica das marcações (redução da imunorreatividade para GFAP) no grupo STZ-GR quando comparado ao grupo STZ, indicando a existência de efeito significante no fator Tratamento. Os grupos CTR e GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si (Fig. 12).

100um



**Figura 12** – (A) Fotomicrografias digitais representativas de cortes coronais do hipocampo de rato ilustrando a marcação de células GFAP positivas no Hilo do GD, 21 dias após a injeção icv-STZ (STZ e STZ-GR) ou solução Ringer (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra de marcação). (B) Quantificação da Imunorreatividade para GFAP (astrócitos GFAP-positivos) no Hilo do GD. (C) Intensidade óptica das marcações dos astrócitos imunorreativos no Hilo do GD. CTR (n=3); GR (n=5); STZ (n=5); STZ-GR (n=5). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Dados expressos como média ± SEM. Escala=100 µm, objetiva 10x. Valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Bonferroni).

#### 5.6.3 Imunorreatividade para GFAP – Região CA3

Foi observado que os animais lesionados com icv-STZ apresentaram, conforme ANOVA, um aumento da resposta astrocitária em CA3, quando comparados com os outros grupos, indicando a existência de efeito significante para o fator lesão. Os animais do grupo STZ-GR apresentaram uma redução no número de células marcadas em CA3 quando comparados com o grupo STZ, indicando uma redução da imunorreatividade para GFAP e a existência de efeito significante para o fator tratamento.

A análise de densidade óptica das marcações revelou conforme ANOVA, que os animais do grupo STZ apresentaram um aumento expressivo na intensidade óptica das marcações quando comparados aos outros grupos, indicando efeito significante para o fator lesão. Foi observada, uma redução da intensidade óptica das marcações (redução da imunorreatividade para GFAP) no grupo STZ-GR quando comparado ao grupo STZ, indicando a existência de efeito significante no fator Tratamento. Os grupos CTR e GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si (Fig.13).



**Figura 13** – (A) Fotomicrografias digitais representativas de cortes coronais do hipocampo de rato ilustrando a marcação de células GFAP positivas da região CA3 do hipocampo, 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução Ringer (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra de marcação). (B) Quantificação da Imunorreatividade para GFAP (astrócitos GFAP-positivos) na região CA3. (C) Intensidade óptica das marcações dos astrócitos imunorreativos na região CA3. CTR (n=3); GR (n=5); STZ (n=5); STZ-GR (n=5). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Dados expressos como média ± SEM. Escala=100 µm, objetiva 10x. Valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Bonferroni).
#### 5.6.4 Imunorreatividade para GFAP – Região CA1

Foi observado que os animais lesionados com icv-STZ (grupo STZ) apresentaram, conforme ANOVA, um aumento da resposta astrocitária em CA1, quando comparados com os grupos CTR e GR, indicando a existência de efeito significante para o fator lesão.

Os animais do grupo STZ-GR apresentaram uma redução no número de células marcadas em CA1 quando comparados com o grupo STZ, indicando uma redução da imunorreatividade para GFAP e a existência de efeito significante para o fator tratamento.

A análise de densidade óptica das marcações revelou, conforme ANOVA, que os animais do grupo STZ apresentaram um aumento expressivo na intensidade óptica das marcações quando comparados aos grupos CTR, GR e STZ-GR indicando efeito significante para o fator lesão. Além disso, o grupo STZ-GR apresentou maior imunorreatividade para GFAP quando comparado com os grupos CTR e GR. Os grupos CTR e GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si (Fig. 14).



**Figura 14** – (A) Fotomicrografias digitais representativas de cortes coronais do hipocampo de rato ilustrando a marcação de células GFAP positivas da região CA1 do hipocampo, 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução Ringer (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra de marcação). (B) Quantificação da Imunorreatividade para *GFAP* (astrócitos GFAP-positivos) da região CA1. (C) Intensidade óptica das marcações dos astrócitos imunorreativos da região CA1. CTR (n=3); GR (n=5); STZ (n=5); STZ-GR (n=5). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Dados expressos como média ± SEM. Escala=100 µm, objetiva 10x. Valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Bonferroni).

#### 5.6.5 Imunorreatividade para IBA1 – Giro Denteado

Foi observado que os animais que receberam a administração icv-STZ (grupo STZ) apresentaram, conforme ANOVA, um aumento da ativação microglial, representado pelo aumento de células IBA-1 positivas no Giro Denteado (GD), quando comparados com os grupos CTR e GR, indicando a existência de efeito significante para o fator lesão. O grupo STZ-GR não apresentou redução significante no número de células IBA1 positivas marcadas no GD quando comparado ao grupo STZ, além disso, os grupos CTR, GR e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si.

A análise de densidade óptica das marcações revelou conforme ANOVA, que os animais do grupo STZ apresentaram um aumento na intensidade óptica das marcações quando comparados aos grupos CTR e GR, indicando efeito significante para o fator lesão. Os animais do grupo STZ e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si. Os grupos CTR, GR e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si. (Fig. 15).



**Figura 15** – (A) Fotomicrografias digitais representativas de cortes coronais do hipocampo de rato ilustrando a marcação de células IBA-1 positivas do Giro Denteado (GD), 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução Ringer (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra de marcação). (B) Quantificação da Imunorreatividade para IBA-1 (células Iba-1-positivas) no GD do hipocampo. (C) Intensidade óptica das marcações da micróglia imunorreativa do GD. CTR (n=3); GR (n=4); STZ (n=4); STZ-GR (n=4). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Dados expressos como média ± SEM. Escala=100 µm, objetiva 10x. Valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Bonferroni).

#### 5.6.6 Imunorreatividade para IBA1 – Hilo do Giro Denteado

Foi observado que os animais que receberam a administração icv-STZ (grupo STZ) apresentaram, conforme ANOVA, um aumento da ativação microglial representado pelo aumento de células IBA-1 positivas no Hilo do GD, quando comparados com os grupos CTR e GR, indicando a existência de efeito significante para o fator lesão. O grupo STZ-GR não apresentou redução significante no número de células IBA-1 positivas marcadas no HL quando comparado ao grupo STZ e os grupos não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si. Além disso, os grupos CTR, GR e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si.

A análise de densidade óptica das marcações revelou conforme ANOVA, que os animais do grupo STZ apresentaram um aumento na intensidade óptica das marcações quando comparados aos grupos CTR e GR, indicando efeito significante para o fator lesão. Os animais do grupo STZ e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si. Os grupos CTR, GR e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados (Fig. 16).





**Figura 16** – (A) Fotomicrografias digitais representativas de cortes coronais do hipocampo de rato ilustrando a marcação de células IBA-1 positivas no Hilo do GD, 21 dias após a injeção icv-STZ (grupos STZ e STZ-GR) ou solução Ringer (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra de marcação). (B) Quantificação da Imunorreatividade para IBA-1 (células IBA-1 positivas) no HL do GD. (C) Intensidade óptica das marcações da micróglia imunorreativa no HL do GD. CTR (n=3); GR (n=4); STZ (n=4); STZ-GR (n=4). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Dados expressos como média ± SEM. Escala=100 µm, objetiva 10x. Valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Bonferroni).

#### 5.6.7 Imunorreatividade para IBA1 – Região CA3

Foi observado que os animais que receberam a administração icv-STZ (grupo STZ e STZ-GR) apresentaram, conforme ANOVA, um aumento da ativação microglial representado pelo aumento de células IBA-1 positivas na região CA3 do hipocampo, quando comparados com os grupos CTR e GR, indicando a existência de efeito significante para o fator lesão. O grupo STZ-GR não apresentou redução significante no número de células IBA-1 positivas marcadas na região CA3 quando comparado ao grupo STZ e os grupos não apresentaram diferenças quando comparados entre si.

A análise de densidade óptica das marcações revelou conforme ANOVA, que os animais do grupo STZ apresentaram um aumento na intensidade óptica das marcações quando comparados aos grupos CTR e GR, indicando efeito significante para o fator lesão. Os animais do grupo STZ e STZ-GR não apresentaram diferenças quando comparados entre si. Os grupos CTR, GR e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados (Fig. 17).



Figura 17 – (A) Fotomicrografias digitais representativas de cortes coronais do hipocampo de rato ilustrando a marcação de células IBA-1 positivas da região CA3 do hipocampo, 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução Ringer (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra de marcação). (B) Quantificação da Imunorreatividade para IBA-1 (células Iba-1- positivas) na região CA3. (C) Intensidade óptica das marcações da micróglia imunorreativa na região CA3. CTR (n=3); GR (n=3); STZ (n=5); STZ-GR (n=4). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina - Geleia Real. Dados expressos como média ± SEM. Escala=100 µm, objetiva 10x. Valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Bonferroni).

Grupos

Grupos

#### 5.6.8 Imunorreatividade para IBA1 – Região CA1

Foi observado que os animais que receberam a administração icv-STZ (grupo STZ) apresentaram, conforme ANOVA, um aumento da ativação microglial representado pelo aumento de células IBA-1 positivas na região CA1 do hipocampo, quando comparados com os grupos CTR e GR, indicando a existência de efeito significante para o fator lesão. Além disso, o grupo STZ-GR não apresentou diferença significante no número de células IBA-1 positivas quando comparado aos grupos CTR, GR e STZ.

A análise de densidade óptica das marcações revelou conforme ANOVA, que os animais do grupo STZ apresentaram um aumento na intensidade óptica das marcações quando comparados aos grupos CTR e GR, indicando efeito significante para o fator lesão. Os animais do grupo STZ e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si. Os grupos CTR, GR e STZ-GR não apresentaram diferenças significantes quando comparados quando comparados entre si.



**Figura 18** – (A) Fotomicrografias digitais representativas de cortes coronais do hipocampo de rato ilustrando a marcação de células IBA-1 positivas da região CA1, 21 dias após a injeção icv de STZ (STZ e STZ-GR) ou solução Ringer (CTR e GR) (as setas indicam uma amostra de marcação). (B) Quantificação da Imunorreatividade para IBA-1 (células Iba-1- positivas) na região CA1 do hipocampo. (C) Intensidade óptica das marcações da micróglia imunorreativa na região CA1 do hipocampo. CTR (n=3); GR (n=4); STZ (n=5); STZ-GR (n=4). CTR=Controle; GR=Geleia Real; STZ=Estreptozotocina; STZ-GR=Estreptozotocina – Geleia Real. Dados expressos como média ± SEM. Escala=100 µm, objetiva 10x. Valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Bonferroni).

5.7 Avaliação do efeito da administração intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) e/ou do tratamento com geleia real na expressão de cada subtipo de receptor muscarínico (M<sub>1</sub> - M<sub>5</sub>)

5.7.1 Porcentagem de Imunoprecipitação de cada Subtipo de Receptor Muscarínico (M1 – M5) em Hipocampo de Animais Controle (CTR)

Na Figura 19 estão apresentadas as porcentagens de imunoprecipitação de cada subtipo de receptor muscarínico (M<sub>1</sub> a M<sub>5</sub>), obtida no hipocampo de ratos do grupo CTR. Um maior percentual do receptor M<sub>1</sub> (65,0  $\pm$  0,8 %, n=3), seguido do M<sub>2</sub> (37,91  $\pm$  0,4%, n=3) foi observado no hipocampo de ratos. Em relação aos receptores M<sub>3</sub> e M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub>, uma menor detecção desses subtipos foi também obtida (respectivamente 13,45  $\pm$  0,55, n=3, 10,31  $\pm$  0,36, n=3 e 2,27  $\pm$  0,03%, n=3).

O perfil de expressão de cada subtipo de receptor muscarínico foi  $M_1 > M_2 > M_3 = M_4 > M_5$  (p < 0,05, ANOVA, teste de Newman-Keuls).



**Figura 19 -** Porcentagem de imunoprecipitação de cada subtipo de receptor muscarínico ( $M_1$  a  $M_5$ ), obtido em hipocampo de ratos do grupo controle (CTR). Os Valores estão expressos como média  $\pm$  SEM. Valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (P < 0.05, ANOVA, teste de Newman-Keuls).

#### 5.7.2 Expressão do Receptor Muscarínico M<sub>1</sub>

Na figura 20 estão apresentados os resultados obtidos dos ensaios de imunoprecipitação para detecção do receptor muscarínico M<sub>1</sub> em hipocampo de ratos dos grupos controle (CTR), estreptozotocina (STZ), estreptozotocina tratado com geleia real (STZ-GR) e geleia real (GR). Houve uma diminuição significativa na expressão do receptor M<sub>1</sub> no grupo STZ (1,22 ± 0,37 fmol/mg de proteína n=4) quando comparado com os grupos CTR e STZ-GR (respectivamente, 3,32 ± 0,80, n=4 e 3,58 ± 0,82 fmol/mg de proteína n=6). O tratamento prolongado com GR feito nos animais do grupo STZ-GR restabeleceu a expressão do receptor M<sub>1</sub> quando comparado ao grupo controle. O grupo GR (tratamento positivo) (2,98 ± 1,70 fmol/mg de proteína, n=5) não apresentou diferença significante na expressão do receptor M<sub>1</sub> quando comparado aos animais do grupo controle (CTR) e ao STZ-GR (p<0,05, ANOVA, teste de Newman-Keuls).



**Figura 20** – Efeito da administração intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) e do tratamento oral dos animais STZ com Geleia Real (STZ-GR) na expressão do receptor muscarínico M1, em hipocampo de ratos. Controle (CTR); Geleia Real (GR). Os valores estão expressos como média  $\pm$  SEM. Os valores indicados por diferentes letras diferem significativamente entre si (p<0,05, ANOVA, teste de Newman-Keuls).

#### 5.7.3 Expressão do Receptor Muscarínico M<sub>2</sub>

Na figura 21 estão apresentados os resultados obtidos dos ensaios de imunoprecipitação para detecção do receptor muscarínico M<sub>2</sub> em hipocampo de ratos dos grupos controle (CTR), estreptozotocina (STZ), estreptozotocina tratado com geleia real (STZ-GR) e geleia real (GR). Não houve diferença significante na expressão do receptor M<sub>2</sub> entre os grupos CTR, STZ, STZ-GR e GR (respectivamente, 1,77  $\pm$  0,75 n=4; 0,44  $\pm$  0,34 n=4; 1,44  $\pm$  0,58 n=6; 0,00  $\pm$  0,82 n=5, fmol/mg de proteína) (p>0,05, ANOVA).



**Figura 21** – Efeito da administração intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) e do tratamento oral dos animais do grupo STZ com Geleia Real (STZ-GR) na expressão do receptor muscarínico M2, em hipocampo de ratos. Controle (CTR); Geleia Real (GR). Os valores estão expressos como média ± SEM. Valores não diferiram entre si (p>0,05, ANOVA).

#### 5.7.4 Expressão do Receptor Muscarínico M<sub>3</sub>

Na figura 22 estão apresentados os resultados obtidos dos ensaios de imunoprecipitação para detecção do receptor muscarínico  $M_3$  em hipocampo de ratos dos grupos controle (CTR), estreptozotocina (STZ), estreptozotocina tratado com geleia real (STZ-GR) e geleia real (GR). Não houve diferença significante na expressão do receptor  $M_3$  entre os grupos CTR, STZ, STZ-GR e GR (respectivamente, 0,48 ± 0,54 n=4; 0,00 ± 0,17 n=4; 0,40 ± 0,80 n=6; 1,90 ± 1,03 n=5, fmol/mg de proteína) (p>0,05, ANOVA).



**Figura 22** – Efeito da administração intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) e do tratamento oral dos animais do grupo STZ com Geleia Real (STZ-GR) na expressão do receptor muscarínico M3, em hipocampo de ratos. Controle (CTR); Geleia Real (GR). Os valores estão expressos como média ± SEM. Valores não diferiram entre si (p>0,05, ANOVA).

#### 5.7.5 Expressão do Receptor Muscarínico M<sub>4</sub>

Na figura 23 estão apresentados os resultados obtidos dos ensaios de imunoprecipitação para detecção do receptor muscarínico M<sub>4</sub> em hipocampo de ratos dos grupos controle (CTR), estreptozotocina (STZ), estreptozotocina tratado com geleia real (STZ-GR) e geleia real (GR). Não houve diferença significante na expressão do receptor M<sub>4</sub> entre os grupos CTR, STZ, STZ-GR e GR (respectivamente, 0,27  $\pm$  0,36 n=4; 0,56  $\pm$  0,11 n=4; 0,03  $\pm$  0,87 n=6; 1,65  $\pm$  0,64 n=5, fmol/mg de proteína) (p>0,05, ANOVA).



**Figura 23** – Efeito da administração intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) e do tratamento oral dos animais do grupo STZ com Geleia Real (STZ-GR) na expressão do receptor muscarínico M4, em hipocampo de ratos. Controle (CTR); Geleia Real (GR). Os valores estão expressos como média ± SEM. Valores não diferiram entre si (p>0,05, ANOVA).

#### 5.7.6 Expressão do Receptor Muscarínico M5

Na figura 24 estão apresentados os resultados obtidos dos ensaios de imunoprecipitação para detecção do receptor muscarínico M<sub>5</sub> em hipocampo de ratos dos grupos controle (CTR), estreptozotocina (STZ), estreptozotocina tratado com geleia real (STZ-GR) e geleia real (GR). Não houve diferença significante na expressão do receptor M<sub>5</sub> entre os grupos CTR, STZ, STZ-GR e GR (respectivamente,  $0,64 \pm 0,22$  n=4;  $0,15 \pm 0,36$  n=4;  $0,0 \pm 0,71$  n=6;  $0,56 \pm 0,34$  n=5, fmol/mg de proteína) (p>0,05, ANOVA).



**Figura 24** – Efeito da administração intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) e do tratamento oral dos animais do grupo STZ com Geleia Real (STZ-GR) na expressão do receptor muscarínico  $M_5$ , em hipocampo de ratos. Controle (CTR); Geleia Real (GR). Os valores estão expressos como média  $\pm$  SEM. Valores não diferiram entre si (p>0,05, ANOVA).

### 6 DISCUSSÃO

A injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (icv-STZ) tem sido proposta por diversos grupos nos últimos anos como um modelo animal representativo da DAE em ratos. Esse modelo foi capaz de induzir muitas das deficiências moleculares, histológicas e comportamentais presentes em humanos acometidos pela DA. A presença de declínio progressivo da cognição, fosforilação de tau e agregação amiloide, deficiência no metabolismo da glicose encefálica, danos na sinalização de insulina, prejuízos ao sistema colinérgico e a presença da micróglia e astrócitos reativos, são características já evidenciadas nesse modelo (Chen et al., 2013; Rostami et al., 2017; Biswas et al., 2018).

No presente estudo, os nossos resultados demonstraram que os animais injetados com icv-STZ apresentaram comprometimento cognitivo, diminuição na expressão do receptor M<sub>1</sub> e alterações histoquímicas em células gliais. Neste sentido, mostramos que o tratamento prolongado com a geleia real (GR) foi capaz de atenuar os danos induzidos pela injeção icv-STZ, observados nos testes comportamentais do Labirinto Aquático de Morris e reconhecimento de objetos, bem como na expressão do receptor M<sub>1</sub> muscarínico. Além de reduzir a presença astroglial nas regiões hipocampais CA1, CA3, GD e HL.

Inicialmente, antes de realizarmos a cirurgia estereotáxica, validamos a equivalência da capacidade de aprendizado e o desempenho da memória espacial entre os grupos (período P1). Nosso objetivo foi avaliar se todos os grupos apresentavam as mesmas condições de aprendizado e memória espacial antes da cirurgia. Vale ressaltar, que a plataforma se manteve fixa no mesmo quadrante da piscina apenas durante as tentativas feitas no mesmo dia (4 tentativas por dia), sendo a cada dia trocada para outro quadrante aleatoriamente. Neste sentido, observamos que a latência para encontrar a plataforma foi progressivamente menor a partir da tentativa T1 para a T4. Este fato mostra que os animais não sabem a localização da plataforma na T1 e no decorrer das tentativas aprendem a localização da plataforma, evidenciada pela diminuição na latência para encontrar a plataforma. Esse protocolo permitiu avaliar a memória operacional espacial dos ratos em todos os períodos investigados (P1, P2 e P3). Em seguida, mostramos que a injeção icv-STZ, realizada no período P2, foi capaz de causar prejuízos no aprendizado e memoria espacial operacional dos ratos. Esses danos foram observados do 4º ao 20º dia após a injeção,

nos testes comportamentais do Labirinto Aquático de Morris, caracterizados por aumento de latência para encontrar a plataforma, maior distância percorrida e menor tempo de permanência na área do contador. Estes fatos mostram que os animais do grupo icv-STZ apresentaram uma melhora muito pequena na performance da memória espacial ao longo das 4 tentativas realizada em cada sessão (dia) do teste, a qual é característica de animais com lesão hipocampal, incluindo o Giro Denteado, como mostrado por Xavier et al., 1999.

Durante os testes foi estabelecido um intervalo de tempo entre as tentativas de 5 min IET = 5. Estes efeitos deletérios da icv-STZ também foram observados anteriormente por nosso grupo (Silva, 2017; Silva et al., 2020) e outros trabalhos também relataram os mesmos prejuízos utilizando de protocolo semelhante ao usado na presente dissertação (Bokare et al., 2018; Dubey et al., 2018). A análise dos resultados obtidos no período P3 mostram os efeitos benéficos do tratamento prolongado com a GR nos prejuízos induzidos pela injeção icv-STZ. Neste sentido, observamos uma redução da latência para encontrar a plataforma nas tentativas T2, T3 e T4 dos animais do grupo STZ-GR em relação ao grupo STZ, evidenciando que o tempo de retenção da memória operacional desses animais foi melhorado no decorrer das tentativas com IET=5. No entanto, a latência apresentada pelos animais do grupo STZ-GR ainda foi maior que a apresentada pelos animais do grupo controle, mostrando um efeito parcial nos benefícios da GR sobre os animais lesionados pelo STZ. Em estudos anteriores, nosso grupo mostrou que o tempo de intervalo entre as tentativas pôde influenciar na retenção da informação na memória operacional dos animais lesionados. Inicialmente foi utilizado um intervalo entre as tentativas de 15 minutos (IET =15) e foi observado que essa faixa de tempo dificultou a manifestação dos efeitos benéficos da GR no grupo STZ-GR, evidenciado no desempenho da memória espacial operacional dos animais, pois a informação anteriormente retida, nesse período de tempo (15 min) era perdida e o desempenho desses animais, nos testes, se tornava equivalente aos animais lesionados (STZ) não tratados com GR (Silva, 2017; Silva et al., 2020). Finalmente, quando o intervalo entre tentativas utilizado foi igual a zero (IET=0), foi possível demonstrar os efeitos benéficos do tratamento com GR na melhora de desempenho da memória operacional espacial de ratos injetados com icv-STZ, evidenciado por uma melhora nos parâmetros de latência, distância e % de tempo na área do contador que foram comparáveis com os animais dos grupos CTR e GR e diferiram do STZ. Assim, vemos que com o teste do labirinto aquático de Morris é possível avaliar o tempo de retenção da memória operacional pela variação do intervalo entre as tentativas. Em conjunto, esses resultados revelam que a GR melhora os processos de retenção da memória espacial operacional, porém, de uma forma dependente do intervalo de tempo entre as tentativas.

O Teste de reconhecimento de objetos (RO) é um ensaio comportamental muito utilizado para investigar alterações no aprendizado e memória de curto e longo prazo dependente do hipocampo em roedores. Consiste em analisar o comportamento inato dos ratos em explorar objetos novos (a novidade) em detrimento de objetos antigos (algo familiar) (Ennaceur e Delacour, 1988; Lueptow et al., 2017). Diversos estudos realizados nos últimos anos demonstraram que a administração icv-STZ no cérebro de ratos e camundongos provoca déficits de aprendizado e memória (Liu et al., 2014; Santos et al., 2015; Ravelli et al., 2017). Os nossos resultados demonstraram que a injeção icv-STZ induziu um déficit nas memórias de curto e longo prazo dos animais no teste de RO (grupo STZ), observados no 14° e 15° dia após a lesão. Estes resultados estão de acordo com investigações anteriores relatadas na literatura (Elçioğlu et al., 2013; Elcioğlu et al., 2016; Ravelli et al., 2017). Entretanto, o tratamento com GR (no grupo STZ-GR) não foi capaz de reverter os prejuízos tanto na memória de curto como de longo prazo avaliadas pelo teste de RO. Apesar disso, os grupos STZ-GR, GR e CTR não diferiram significativamente entre si, o que indica uma tendência do tratamento com GR em preservar essas memórias. Podemos dizer que os déficits observados no aprendizado e memoria espacial operacional, avaliada no labirinto aquático de Morris e na memória de curto e longo prazo, avaliada no teste de reconhecimento de objetos, observados no presente estudo em animais injetados icv-STZ poderiam estar relacionados a lesões nas regiões do hipocampo, inclusive o giro denteado e esses resultados estão de acordo com outros vigentes na literatura (Xavier et al., 1999; Moses et al., 2005; Faraji et al., 2008; Ravelli et al., 2017). Ainda mais, em trabalho anterior mostramos que a injeção icv-STZ foi capaz de induzir morte neuronal hipocampal, aumento do nível de estresse oxidativo no GD e no hilo. Além disso, diminuir a neurogênese, demonstrada pela redução da proliferação e sobrevivência de novos neurônios. E o mais relevante, a GR foi capaz de atenuar os efeitos deletérios do STZ (Silva, 2017; Silva et al., 2020).

Referente à avaliação da atividade geral medida em Campo Aberto, a injeção icv-STZ não causou alterações significantes na frequência de locomoção, levantar,

tempo de limpeza e tempo de parado em relação aos animais dos grupos CTR e GR. Portanto, podemos dizer que os animais icv-STZ não apresentaram déficit motor, visto que a atividade de locomoção e levantar não diferem do controle. Neste sentido, em trabalho anterior de nosso grupo (Silva, 2017; Silva et al., 2020), mostramos que animais icv-STZ apresentam uma velocidade de natação igual àquela dos animais controle no teste de labirinto aquático de Morris e que o teste do labirinto em cruz elevado, não mostrou indícios de ansiedade. O ensaio de CA foi realizado no 13° dia após a cirurgia icv-STZ e no 7° dia após o início do tratamento com GR. Os prejuízos provocados por icv-STZ no aprendizado e memória espacial dos sujeitos, assim como os danos cognitivos e na memória de curta e longa duração identificados no teste de Reconhecimento de Objetos, podem estar correlacionados com as alterações histológicas também relatadas em nosso projeto.

A presença de neuroinflamação mediada pela glia, incluindo microglia e astrócitos ativados, tem sido apresentada por diversos grupos como um dos principais agentes contribuintes para os processos neurodegenerativos e déficits cognitivos observados na DA (Fakhoury et al., 2018). Vale salientar, que esse fenômeno também se encontra presente em diversas doenças neurodegenerativas com diferentes etiologias (Hansen et al., 2018). Estudos mostram que os cérebros post-mortem de pacientes com DA apresentam níveis elevados de várias citocinas pró-inflamatórias relacionadas à glia reativa (Fuster-Matanzo et al., 2013). Outra característica comum em indivíduos com DA é a presença da micróglia e de astrócitos ativados concentrados próximos de placas amiloides. Essas descobertas sustentam as hipóteses que colocam a inflamação no SNC como um evento fundamental na patogênese da DA (Morimoto et al., 2011; Wang et al., 2015; Hansen et al., 2018).

As análises histológicas de nosso trabalho mostram que os animais icv-STZ (grupo STZ) apresentaram um aumento expressivo da presença de astrócitos e micróglia em todas as regiões do hipocampo (CA1, CA3, GD e HL) em comparação com os grupos CTR e GR. Os animais icv-STZ tratados com GR por 14 dias consecutivos (grupo STZ-GR), apresentaram uma redução significante de astrócitos (imunorreatividade para GFAP) nas regiões do GD, HL, CA3 e CA1. Entretanto, o tratamento com a GR (grupo STZ-GR) não foi capaz de reverter o aumento na ativação de células microgliais (imunorreatividade para IBA-1) causado por icv-STZ em nenhuma das regiões do hipocampo investigadas (CA1, CA3, GD e HL). Vale pontuar que outras investigações também demonstraram que a neuroinflamação é

uma característica presente no modelo da DAE em roedores injetados com icv-STZ (Chen et al., 2013).

Diversos trabalhos têm relatado que a ativação microglial e de astrócitos, por meio de eventos patológicos que resultem em perda da homeostase ou alterações teciduais, induzem processos dinâmicos de natureza dupla que podem resultar em efeitos benéficos ou prejudiciais para o cérebro (Heneka et al., 2015; Fakhoury, 2018). A resposta inflamatória mediada por astrócitos e pela micróglia, diante de insultos no SNC é complexa e dependente de uma série de fatores, como o estado de ativação das células, o ambiente circundante, o estágio da doença e a forma como a região cerebral é lesionada (Hansen et al., 2018; Frost et al., 2019). Mesmo nos diferentes modelos animais de lesão cerebral traumática (TCE) esse padrão se repete e a resposta inflamatória mediada pela micróglia e astrócitos, a primeira linha de defesa para iniciar uma cascata inflamatória ao detectar o perigo, é gerada de forma dependente da natureza da lesão, tempo e gravidade, revelando o carácter dualístico e complexo das respostas gliais (Karve et al., 2016). Por exemplo, astrócitos e micróglia podem produzir uma variedade de fatores neuroprotetores que ajudam a prevenir lesões neuronais, são elementos críticos para o reparo do tecido nervoso e contribuem principalmente para a melhora da função neuronal e do desempenho cognitivo. Por outro lado, quando ativados, podem liberar uma variedade de mediadores pró-inflamatórios que criam um ambiente autodestrutivo que contribui para neurodegeneração, além disso, estão associados a placas amiloides e emaranhados neurofibrilares intracelulares no cérebro de pacientes com DA (Rodríguez-Arellanoet al., 2016; Hansen et al., 2018; Fakhoury, 2018). É importante destacar que a micróglia ativada pode sintetizar citocinas (II-1a, TNFa e C1q) que ativam astrócitos, inclusive os astrócitos reativos neurotóxicos A1, um tipo celular presente em doenças neurodegenerativas humanas como a DA e que são altamente reativos com capacidade de induzir a morte de neurônios e oligodendrócitos (Liddelow et al., 2017). Curiosamente, os astrócitos também possuem a capacidade de regular de forma significativa a ativação microglial (Hailer et al., 2001) e também são capazes de atenuar respostas inflamatórias microgliais em ambientes com privação de oxigênio e glicose (in vitro) (Kim et al., 2010). Apesar do tratamento com a GR não ter apresentado efeitos significativos na redução das células positivas para IBA-1 (micróglia) nos ratos injetados com icv-STZ, trabalhos recentes utilizando diferentes protocolos, revelaram efeitos relevantes da GR na redução da neuroinflamação. O 10HDA representa o principal componente da fração lipídica da GR. Este composto foi capaz de reduzir as concentrações de micróglia e astrócitos ativados no hipocampo e no córtex de camundongos macho (C57BL/6J) injetados com LPS intraperitoneal em um modelo animal de neuroinflamação (You et al., 2019). Em outro estudo que utilizou um modelo murino de células da micróglia BV2 (in vitro) incubadas com LPS, a GR apresentou um efeito anti-inflamatório capaz de inibir a expressão dos níveis de mRNA e de proteínas de dois importantes agentes de processos inflamatórios, o iNOS e COX-2, também foi capaz de alterar a expressão de mRNA de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF-  $\alpha$ e reduziu o estresse oxidativo. Esses mecanismos se deram por meio da supressão da fosforilação das vias de sinalização IkB-a, p38 e JNK e pela inibição da translocação de NF-kB subunidade p65 (You et al., 2018). Em outro trabalho recente envolvendo o 10-HDA em um modelo animal de neuroinflamação por LPS, a ativação da via AMPK/ PI3K/ AKT por 10-HDA demonstrou desempenhar um papel importante na neutralização do estresse oxidativo, suprimindo a produção de espécies reativas de oxigênio na barreira hematoencefálica (BBB) de camundongos C57BL/6 (You et al., 2019). A injeção icv-STZ provoca a inibição das proteínas da via AMPK/ PI3K/ AKT e como consequência provoca alterações que estão envolvidas no aumento do estresse oxidativo e neuroinflamação (Deng et al., 2009). Em contrapartida, a GR e seus constituintes isolados têm apresentado resultados positivos na melhora da capacidade cognitiva de animais com lesão neuronal, na redução do estresse oxidativo e da neuroinflamação.

Pesquisas mostram que o estresse oxidativo, decorrente do desequilíbrio de espécies reativas de oxigênio (EROs), representa um papel central na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, incluindo a DA (Kim et al., 2015). Em estudos anteriores do nosso laboratório, demonstramos que a administração de icv-STZ é capaz de aumentar os níveis de estresse oxidativo no giro denteado e no hilo do hipocampo, além disso, mostramos que o tratamento prolongado com GR possui efeito antioxidante no hilo e tendência de efeito antioxidante no giro denteado do hipocampo. Vale ainda pontuar, que os danos oxidativos identificados anteriormente por nosso grupo no modelo icv- STZ estão de acordo com outras evidências citadas na literatura atualmente (Gupta et al., 2019). Diversos trabalhos têm relatado efeitos antioxidantes da GR. Por exemplo, como um eliminador de radicais livres, no modelo de diabetes mellitus humano e animal, no alívio do estresse oxidativo, na

associados a neuroproteção (Kocot et al., 2018). Desta forma, podemos considerar que a redução nos níveis de astrócitos ativos nas regiões hipocampais de CA3, GD, HL e CA1 sejam decorrentes do efeito antioxidante e neuroprotetor da GR que, desta forma colabora para a recuperação/reversão dos danos causados pela injeção icv-STZ, incluindo o estresse oxidativo (presente na neuroinflamação) e a modulação de vias de sinalização como a AMPK/ PI3K/ AKT pelo ácido 10-HDA. Em adição, esses processos podem ser refletidos na melhora da memória espacial operacional e na tendência de melhora na memória de curto e longo prazo dos ratos submetidos à lesão cerebral pelo STZ. Finalmente, podemos dizer que a injeção icv-STZ causou prejuízos nas memoria espacial operacional medida em labirinto aquático de Morris e memória de curto e longo prazo avaliadas pelo teste de Reconhecimento de Objetos e promoveu a ativação glial, da micróglia e de astrócitos. Ainda, observamos que o tratamento prolongado com geleia real foi capaz de induzir efeitos benéficos tanto no aprendizado e memória como na diminuição da reatividade glial. Assim, nossos dados reforçam diversos estudos que mostram a geleia real como um composto promissor para o desenvolvimento de novas terapias direcionadas ao tratamento de doenças neurodegenerativas e regulação do estresse oxidativo.

Diversos estudos da literatura têm mostrado que a administração intracerebroventricular de STZ promove alterações na neurotransmissão colinérgica. Neste sentido, foram descritos diminuição nos níveis e atividade da acetilcolina e da colina acetiltransferase (Sorial et al., 2017; Sonkusare et al., 2005; Sodhi e Singh, 2013). Contrariamente, um aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase foi também mostrado (Sorial et al., 2017; Sonkusare et al., 2005; Sodhi e Singh, 2013). Além disso, vale ressaltar, que os prejuízos apresentados no aprendizado e memória de ratos após administração intracerebroventricular de STZ também são atribuídos à disfunção colinérgica (Nitsch e Hoyer, 1991; Bokare et al., 2018). Dentre os 5 subtipos de receptores muscarínicos, o receptor M<sub>1</sub> está expresso de forma predominante no hipocampo (Abrams et al., 2006; Cardoso et al., 2010). Em adição, evidências farmacológicas sugerem que a acetilcolina atuando no receptor muscarínico do subtipo M<sub>1</sub> pode mediar os efeitos cognitivos e a plasticidade sináptica do hipocampo (Ballinger et al., 2016). A estimulação do receptor M1 provoca a ativação das proteínas  $G\alpha_q$  que está relacionada com a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), produzindo inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG), uma ação mediada pela enzima fosfolipase C (PLC) (Porter et al., 2002; Nash et al., 2004; Willets et al., 2004). Os receptores de IP<sub>3</sub> podem mediar à propagação de ondas de Ca<sup>2+</sup> em dendritos do hipocampo induzidos pela ativação de receptores muscarínicos (Power e Sah, 2002).

No presente estudo foram também investigadas as possíveis alterações induzidas pela injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) e do tratamento de animais STZ com Geleia Real (STZ-GR) sobre os subtipos receptores muscarínicos ( $M_1 - M_5$ ) no hipocampo, uma área cerebral importante para os processos cognitivos. Para isso, ensaios de imunoprecipitação com anticorpo primário policional que reconhece a região aminoterminal de cada um dos cinco subtipos dos receptores muscarínicos foi determinado em receptor solubilizado, obtido de preparação de membrana de hipocampo de ratos dos diferentes grupos experimentais. A injeção intracerebroventricular de estreptozotocina induziu uma diminuição significativa na expressão do subtipo M<sub>1</sub> quando comparada ao controle. O tratamento dos animais STZ com geleia real (STZ-GR) recuperou a expressão desse subtipo, similar ao observado no grupo controle. No que diz respeito ao controle positivo (grupo GR), não foi observada diferença significante na expressão do receptor M<sub>1</sub> quando comparado aos animais do grupo controle e STZ-GR, sugerindo, em conjunto, um efeito da geleia real sobre a expressão desse subtipo de receptor. Por outro lado, guando os subtipos M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> foram analisados, não foi detectada diferença significante na expressão desses receptores entre os animais dos diferentes grupos experimentais (CTR, STZ, STZ-GR e GR). Assim, estes resultados indicam uma modulação diferencial do subtipo M1 dos animais que receberam injeção intracerebroventricular de estreptozotocina. Além disso, o tratamento desses animais com geleia real recuperou a expressão do receptor M<sub>1</sub> no hipocampo, indicando um papel importante sobre a neurotransmissão colinérgica muscarínica. É importante enfatizar que foi avaliado o perfil de expressão de cada subtipo de receptor muscarínico no hipocampo determinado em animais do grupo controle ( $M_1 > M_2 > M_3$  $= M_4 > M_5$ ). Esse perfil foi similar ao reportado na literatura através de diferentes técnicas, tais como, estudos de imunohistoquímica em hipocampo de ratos machos (Levey, 1993), estudos de ligação da [<sup>3</sup>H]NMS em hipocampo de camundongos machos geneticamente modificados, deficientes em um dos cinco genes que codificam os subtipos de receptores muscarínicos (Oki et al., 2005) e em ensaios de imunoprecipitação em hipocampo de ratas fêmeas na fase de proestro (Cardoso et al., 2010). Assim, esses resultados obtidos em nosso laboratório refletem que os ensaios foram realizados dentro de condições experimentais ideais.

O mecanismo de ação da injeção intracerebroventricular de STZ no cérebro tem sido atribuído à diminuição (Agrawal et al., 2009), dessensibilização dos receptores de insulina, regulação negativa do substrato do receptor de insulina e hipometabolismo de glicose (Wang et al., 2010). Evidências indicam que os receptores muscarínicos atuam nos processos que envolvem a proteção de células neuronais contra a apoptose induzida por diferentes estímulos, inclusive citocinas próinflamatórias e agentes pró-apoptóticos (De Sarno et al., 2005). Estudos recentes, em modelo animal de diabetes mellitus induzido por STZ (MLD-STZ), revelaram que os receptores muscarínicos possuem papel importante na regulação positiva da produção de insulina e proteção contra a apoptose induzida por STZ (Fernández-Cabezudo et al., 2019). Esses achados sugerem que os receptores muscarínicos podem influenciar as alterações metabólicas decorrentes das anormalidades na sinalização de insulina. Entretanto, os mecanismos envolvendo o papel dos receptores muscarínicos na modulação da insulina no SNC e na DA precisam ser melhor esclarecidos.

Estudos realizados nos últimos anos têm mostrado o envolvimento do receptor M<sub>1</sub> nas principais alterações patológicas encontradas na DA (Medeiros et al., 2011). Em adição, diferentes investigações têm também mostrado que a ativação do receptor muscarínico M<sub>1</sub> promove efeitos antioxidantes *in vitro* (Xin et al., 2020; Espada et al., 2009) e *in vivo* (Frinchi et al., 2019). Além disso, efeitos anti-inflamatórios no hipocampo de roedores em modelos de demência também foram observados (Frinchi et al., 2019; Cuello et al., 2019; Medeiros et al., 2011). Estudos mais recentes relataram que a estimulação do receptor muscarínico M<sub>1</sub> ativa mecanismos de inibição de mediadores pró-inflamatórios de forma seletiva (IL-1β e IL-6), ainda, sugerem que esse mecanismo está envolvido em processos de regulação de memória e aprendizado (Konar et al., 2019). Por fim, ensaios clínicos de pacientes com DA demonstraram que a estimulação desse subtipo de receptor está associada à regeneração neural e à diminuição da concentração de β-amilóide (Verma et al., 2018).

Nossos resultados, em conjunto com os dados da literatura, corroboram e sustentam os relatos no que diz respeito aos efeitos deletérios da injeção intracerebroventricular de STZ sobre a neurotransmissão colinérgica muscarínica. Assim, pela primeira vez, identificamos alterações na expressão do receptor muscarínico do subtipo M<sub>1</sub> no hipocampo em animais submetidos ao modelo icv-STZ.

Tais alterações estão em concordância com os déficits cognitivos e a neuroinflamação, características amplamente citadas na literatura, presentes tanto em pacientes com DA como no modelo de administração intracerebroventricular de estreptozotocina. O tratamento com GR foi capaz de restabelecer os receptores do subtipo M<sub>1</sub>. Além disso, a recuperação desse subtipo de receptor correlacionou-se com a recuperação da memória de trabalho e com a redução da neuroinflamação mediada pela glia. Estudos futuros serão necessários para determinar os mecanismos envolvidos no processo de restabelecimento do subtipo muscarínico M<sub>1</sub> no hipocampo após administração de geleia real. Porém, a atividade antioxidante e os efeitos anti-inflamatórios do tratamento de animais STZ com Geleia Real, já foram apresentados previamente por nosso grupo e podem estar envolvidos e justificar esse efeito (Silva et al., 2020).

Assim, todos os parâmetros analisados no presente trabalho estão relacionados com os efeitos neuroprotetores no hipocampo após à administração oral de geleia real. Esses efeitos benéficos no cérebro podem ser atribuídos a alguns compostos da geleia real, os quais podem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal e, assim, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Nesse sentido, entre as substâncias ativas na geleia real destacamos pequenos peptídeos (obtidos a partir da hidrólise das principais proteínas da geleia real, MRJPs), aminoácidos livres, os ácidos graxos de 10 átomos de carbono, ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) e ácido 10hidroxidecanoico, além de óxido de AMP-N1 (Cornara et al., 2017; Kocot et al., 2018). Foi demonstrado que pequenos peptídeos, com resíduos de 2-4 aminoácidos isolados da GR contendo resíduos de Tyr no terminal C, apresentam forte atividade sequestradora de radical hidroxil, a qual é sugerida agir como sequestradores de radicais livres (Guo et al., 2009). Com relação ao ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA), o principal e único ácido graxo encontrado especificamente na GR, foi demonstrado que ele participa da produção de moléculas importantes para a função cerebral como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Ito et al., 2003; You et al., 2018) e neurogênese em células progenitoras neurais (Hattori et al., 2007). Weiser et al., 2017 relataram que o ácido 10-hidroxi-2-decenóico aumentou a viabilidade e o crescimento dos neurônios hipocampais e o uso de modelos in vitro de neurodegeneração relacionada à idade mostrou que este ácido graxo foi capaz de reduzir a morte celular. Além disso, foi observada uma diminuição da ansiedade em ratos machos idosos tratados com 10-HDA (Weiser et al., 2017). Outro componente da GR que poderia responder, pelo menos em parte, pelos benefícios neuronais da GR é o monofosfato de adenosina (AMP) N1-óxido, que é encontrado apenas na GR, e apresenta um fator neurotrófico. Assim, o AMP N1-óxido induz o processo de neurite, suprime a proliferação de células PC12 e estimula a expressão de uma proteína específica de neurônios maduros, demonstrando sua atividade estimuladora para induzir a diferenciação neuronal de células PC12. Além disso, foi sugerido que o AMP N1-óxido atua em receptores de adenosina acoplados a adenilil ciclase e poderia desempenhar um papel na modulação da função neuronal por meio de receptores de adenosina (Hattori et al., 2007; Hattori et al., 2010).

Em suma, o tratamento com geleia real reduziu os efeitos deletérios sobre a cognição, a reatividade das células astrogliais do hipocampo e recuperou a expressão do mAChR M<sub>1</sub> em ratos submetidos ao modelo de DA induzida por icv-STZ. Assim, a geleia real e seus componentes podem ter um potencial valor terapêutico para o tratamento de déficits cognitivos com ação benéfica para o sistema colinérgico muscarínico hipocampal e em processos degenerativos em células gliais e neuronais.

Por fim, podemos levantar a hipótese de que a redução dos receptores muscarínicos M<sub>1</sub> parece ser uma expressão final do processo degenerativo induzido por STZ. O estresse oxidativo induzido por STZ (Silva et al., 2020) pode levar à ativação glial, que pode desencadear um processo inflamatório, juntamente com a ação da lesão induzida por STZ e, consequentemente, redução do fornecimento de energia. Isso levaria a uma redução neuronal, perda da resposta da neurogênese (Silva et al., 2020) e a consequente redução dos receptores muscarínicos que levaria a um déficit cognitivo.

Assim, nossos dados corroboram diversos estudos que mostram a geleia real como um composto promissor para o desenvolvimento de novas terapias voltadas ao tratamento de doenças neurodegenerativas e regulação do estresse oxidativo. No entanto, os mecanismos pelos quais o RJ e/ou quais componentes atuam como protetores na neurodegeneração precisam de mais estudos.

# 7 CONCLUSÃO

- A administração icv-STZ causou prejuízos na memória operacional espacial de ratos Wistar observados no teste do labirinto aquático de Morris.
- A administração prolongada de Geleia Real melhorou o desempenho dos animais submetidos à injeção icv-STZ no parâmetro latência para encontrar a plataforma no teste do labirinto aquático de Morris.
- Os animais do grupo STZ apresentaram prejuízos na memória de curto (1h) e longo prazo (24h) no teste de Reconhecimento de Objeto Novo, porém o tratamento com GR não conseguiu amenizar a lesão causada por STZ.
- A administração icv-STZ e/ou o tratamento prolongado com Geleia Real em ratos não provocaram alterações na atividade exploratória medida em Campo Aberto.
- A administração icv-STZ causou um aumento da imunorreatividade para GFAP e IBA-1 em todas as regiões do hipocampo avaliadas (GD, HL, CA3 e CA1).
- O tratamento com GR foi capaz de reduzir os níveis da imunorreatividade para GFAP no GD, HL e CA3, mas não conseguiu reduzir a imunorreatividade para IBA-1.
- A administração intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) induziu uma redução na expressão do receptor muscarínico do subtipo M<sub>1</sub>. Além disso, o tratamento dos animais STZ com Geleia Real (STZ-GR) foi capaz de restaurar os níveis de expressão deste subtipo no hipocampo, sugerindo um papel importante sobre a neurotransmissão colinérgica muscarínica.

## **REFERÊNCIAS\***

ABDALLA, F.M. et al. Effect of estrogen on muscarinic acetylcholine receptor expression in rat myometrium. **Mol Cell Endocrinol**, v. 213, n. 2, p. 139-48, 2004.

ABRAMS, P.; ANDERSSON, K.E. et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. **Br J Pharmacol**, v. 148, p. 565-578, 2006.

AGRAWAL, R.; TYAGI, E.; SHUKLA, R.; NATH, C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 779-787, 2009.

AHMED, T.; ZAHID, S.; MAHBOOB, A.; FARHAT, SM. Cholinergic System and Posttranslational Modifications: An Insight on the Role in Alzheimer's Disease. **Curr Neuropharmacol**, v. 15, p. 480-494, 2017.

AHN, K.C.; LEARMAN, C.R.; BAKER, G.B. et al. Regulation of Diabetes: a Therapeutic Strategy for Alzheimer's Disease?. **J Korean Med Sci**, v. 34, p. 1-26, 2019.

AL NAGGAR, Y. et al. Fighting against the second wave of COVID-19: Can honeybee products help protect against the pandemic?. **Saudi J Biol Sci**, v. 28, p. 1519-1527, 2021.

ALSHARIF, W.; QURASHI, A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. **Radiography (Lond)**, v. 27, p. 682-687, 2021.

AMARAL, D.G.; SCHARFMAN, H.E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Prog Brain Res**, v. 163, p. 3–22, 2007.

ANAND, K.S.; DHIKAV, V. Hippocampus in health and disease: An overview. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 15, n. 4, p. 239-246, 2012.

ARAUJO, D.M.; LAPCHAK P.A. et al. Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. **J Neurochem,** v. 50, n. 6, p. 1914-1923, 1988.

ARAYA, R.; NOGUCHI, T.; YUHKI, M. et al. Loss of M5 muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. **Neurobiol Dis,** v. 24, p. 334–344, 2006.

ASHKENAZI, A.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D.J. Acetylcholine analogue stimulates DNA synthesis in brain-derived cells via specific muscarinic receptor subtypes. **Nature**, v. 340, p. 146-150, 1989.

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J.W.; J. An M2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. **Science**, v. 238, p. 672-675, 1987.

AVERY, E.E.; BAKER L.D.; ASTHANA, S. Potential role of muscarinic agonists in Alzheimer's disease. **Drugs Aging,** v. 11, n. 6, p. 450-459, 1997.

BABAEI, S. et al. Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. *Vet Res Forum*, v. 7, p. 13-20, 2016.

BALLINGER, E.C.; ANANTH, M. et al. Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. **Neuron,** v. 91, p. 1199-1218, 2016.

BARAGE, S.H.; SONAWANE, K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Neuropeptides**, v. 52, p. 1-18, 2015.

BEKRIS, L.M.; YU, C.E.; BIRD, T.D.; TSUANG, D.W. Genetics of Alzheimer disease. J Geriatr Psychiatry Neurol, v. 23, p. 213–227, 2010.

BÍLIKOVA, K.; HUANG, S.C.; LIN, I.P.; ŠIMUTH, J.; PENG, C.C. Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of Apis mellifera. **Peptides**, v. 68, p. 190–196, 2015.

BISWAS, J. et al. Involvement of glucose related energy crisis and endoplasmic reticulum stress: insinuation of streptozotocin induced Alzheimer's like pathology. **Cell Signal**, v.42, p. 211–226, 2018.

BISWAS, J.; GOSWAMI, P.; GUPTA, S. *et al.* Streptozotocin Induced Neurotoxicity Involves Alzheimer's Related Pathological Markers: a Study on N2A Cells. **Mol Neurobiology.** v. 53, p. 2794–2806, 2016.

BLANCO-SUÁREZ, E.; CALDWELL, A.; ALLEN, N.J. Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. **J Physiol**, v. 595, p. 1903–1916, 2017.

BŁASZCZYK, J.W. Energy Metabolism Decline in the Aging Brain-Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. **Metabolites**, v. 10, n. 11, p. 450, 2020.

BLOOM, B.S. et al. Cost of Illness of Alzheimer's Disease: How Useful Are Current Estimates?. **The Gerontologist**, v. 43, n. 2, p. 158-164, 2003.

BOKARE, A.M.; BHONDE, M.; GOEL, R.; NAYAK, Y. 5-HT6 receptor agonist and antagonist modulates ICV-STZ-induced memory impairment in rats. **Psychopharmacology (Berl),** v. 235, p. 557–1570, 2018.

BONNER, T.I.; BUCKLEY N.J. et al. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. **Science,** v. 237, p. 527-532, 1987. Erratum in: **Science,** v. 237, 1987.

BONNER, T.I.; YOUNG, A.C. et al. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. **Neuron**, v. 1, p. 403-410, 1988.

BONSI, P.; CUOMO, D. et al. Centrality of striatal cholinergic transmission in Basal Ganglia function. **Front Neuroanat,** v. 5, p. 6, 2011.

BRACZYNSKI, A.K.; SCHULZ, J.B.; BACH, J.P. Vaccination strategies in tauopathies and synucleinopathies. **J Neurochem**, v. 143, p. 467-488, 2017.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BROWN, D.A. Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms. **J Mol Neurosci**, v. 41, p. 340-346, 2010.

CACABELOS, R. Have there been improvements in Alzheimer's disease drug discovery over the past 5 years?. **Journal Expert Opinion on Drug Discovery**, *v*. 13, p. 523–538, 2018.

CACABELOS, R.; TEIJIDO, O.; CARRIL, J.C. Can cloud-based tools accelerate Alzheimer's disease drug discovery?. **Journal Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, p. 215–223, 2016.

CACCAMO, A.; ODDO, S. et al. M1 receptors play a central role in modulating ADlike pathology in transgenic mice. **Neuron**, v. 49, n. 5, p. 671-682, 2006.

CALDER, P.C. Nutrition, immunity and Covid-19. **BMJ Nutr. Prev. Health,** v. 3, p. 74-92, 2020.

CALSOLARO, V.; EDISON, P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. **Alzheimers Dement**, v. 12, p. 719–732, 2016.

CAMPOY, F.J.; VIDAL, C.J. et al. Cholinergic system and cell proliferation. **Chem Biol Interact**, v. 259, n. (Pt B), p. 257-265, 2016.

CARDOSO C.C.; RICARDO V.P.; FRUSSA-FILHO R.; PORTO C.S.; ABDALLA F.M. Effects of 17ß-estradiol on expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes and estrogen receptor alpha in rat hippocampus. **Eur J Pharmacol**, v. 634, p. 192-200, 2010.

CARDOSO, C.C. et al. Effects of estrogen on muscarinic acetylcholine receptors in the rat hippocampus. **Neuroendocrinology**, v. 80, n. 6, p. 379-386, 2004.

CARDOSO, C.C.; RICARDO V.P. et al. Effects of 17ß-estradiol on expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes and estrogen receptor alpha in rat hippocampus. **Eur J Pharmacol**, v. 634, p. 192-200, 2010.

CARRILLO-MORA, P.; LUNA, R.; COLÍN-BARENQUE, L. Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects?. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 795375, 2014.

CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther**, v. 58, p. 319-379, 1993.

CAULFIELD, M.P.; BIRDSALL, N.J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacol Ver**, v. 50, p. 279-290, 1998.

CHEN, Y.; LIANG, Z.; BLANCHARD, J. et al. A Non-transgenic Mouse Model (icv-STZ Mouse) of Alzheimer's Disease: Similarities to and Differences from the Transgenic Model (3xTg-AD Mouse). **Mol Neurobiol**, v. 47, p. 711-725, 2013.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies Prog. **Neurobiol**, v. 108, p. 21-43, 2013.

CHERUBINI, E.; MILES, R. The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it?. *Front Cell Neurosci*, v. 9, p. 1-7, 2015.

CHORNENKYY, Y.; WANG, W.X.; WEI, A.; NELSON, P.T. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus are distinct diseases with potential overlapping metabolic dysfunction upstream of observed cognitive decline. **Brain Pathol**, v. 29 p. 3–17, 2019.

CIPRIANI, G.; DOLCIOTTI, C.; PICCHI, L. et al. Alzheimer and his disease: a brief history. **Neurol Sci**, v. 32, p. 275–279, 2011.

COLLOBY, S.J.; MCKEITH, I.G.; WYPER, D.J.; O'BRIEN, J.T.; TAYLOR, J.P. Regional covariance of muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease using (R, R) [(123)I]-QNB SPECT. **J Neurol**, v. 262, p. 2144-2153, 2015.

CORNARA, L.; BIAGI, M. et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Front. Pharmacol.** v. 8, p. 412, 2017.

CUELLO, A. C.; HALL, H.; DO CARMO, S. Experimental Pharmacology in Transgenic Rodent Models of Alzheimer's Disease. **Front Pharmacol**, v. 10, p. 189, 2019.

CUMMINGS, J.L.; BACK, C. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. **Am J Geriatr Psychiatry,** v. 6, n.2, p. 64-78, 1998.

CUNNANE, S.; NUGENT, S.; ROY, M. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease Nutrition. **Nutrition**, v. 27, p. 3-20, 2011.

DAGAN, S.Y.; TSOORY, M.M.; FAINZILBER, M.; PANAYOTIS, N. COLORcation: A new application to phenotype exploratory behavior models of anxiety in mice. *J* **Neurosci Methods**, v. 27, p. 9–16, 2016.

DAVIS, A.A.; FRITZ, J.J.; WESS, J.; LAH, J.J.; LEVEY, A.I. Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo. **J Neurosci**, v. 30, p. 4190-4196, 2010.

DAVIS, M. et al. Estimating Alzheimer's Disease Progression Rates from Normal Cognition Through Mild Cognitive Impairment and Stages of Dementia. **Curr Alzheimer Res**, v. 15, p. 777-788, 2018.

DE FELICE, F.G. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. **J Clin Invest, v.** 123, p. 531-539, 2013.

DE LA MONTE, S.M.; WANDS, J.R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **J Diabetes Sci Technol**, v. 2, n. 6, p. 1101-1113, 2008.

DE SARNO, P.; SHESTOPAL, S.A.; ZMIJEWSKA, A.A.; JOPE, R.S. Anti-apoptotic effects of muscarinic receptor activation are mediated by Rho kinase. **Brain Res**, v. 1041, p. 112-115, 2005.

DEKOSKY, S.T.; HARBAUGH, R.E. et al. Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. Intraventricular Bethanecol Study Group. **Ann Neurol,** v. 32, n. 5, p. 625-632, 1992.

DENCKER, D.; THOMSEN, M. et al. Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes as Potential Drug Targets for the Treatment of Schizophrenia, Drug Abuse and Parkinson's Disease. **ACS Chem Neurosci,** v. 3, p. 80-89, 2012.

DENG, Y.; LI, B.; LIU, Y.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I.; GONG, C.X. Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease. **Am J Pathol**, v. 175, p. 2089–2098, 2009.

DRAPEAU, M.D.; ALBERT, S.; KUCHARSKI, R.; PRUSKO, C.; MALESZKA, R. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. **Genome Res**, v. 16, p. 1385–1394, 2006.

DRUMMOND, E.; WISNIEWSKI, T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. **Acta Neuropathol**, v.133, p. 155-175, 2017.

DUBEY, H.; GULATI, K.; RAY, A. Amelioration by nitric oxide (NO) mimetics on neurobehavioral and biochemical changes in experimental model of Alzheimer's disease in rats. **Neurotoxicology**, v. 66, p. 58–65, 2018.

EGLEN, R.M.; HEGDE, S.S.; WATSON, N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. **Pharmacol Rev**, v. 48, p. 531-565, 1996.

EHLERT, F.J. Pharmacological analysis of the contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in smooth muscle. **Recept Channels,** v. 9, p. 261-277, 2003.

ELÇIOĞLU, H.; KABASAKAL, L.; ALAN, S.; SALVA, E.; TUFAN, F.; KARAN, M. Thalidomide attenuates learning and memory deficits induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. **Biotech Histochem**, v. 88, p. 145–152, 2013.

ELCIOĞLU, H.K.; ASLAN, E.; AHMAD, S. et al. Tocilizumab's effect on cognitive deficits induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in Alzheimer's model. **Mol Cell Biochem, v.** 420, p. 21–28, 2016.

EL-FIKY, S. et al. Anti-leukemic, anti-HIV, and sialidase activities of royal-jelly proteins. **Patentscope**, PCT/EG2018/000012, WO/2018/188714, 2018.

EL-FIKY, S. et al. Antiviral, antifibrotic and anticancer activities of royal-jelly proteins. **United States Patent and Trademark Office,** US 20200207820, 2020.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J.; A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav. Brain Res**, vol. 31 p. 47–59, 1988.

ERNST, R.L.; HAY, J.W. The US economic and social costs of Alzheimer's disease revisited. **Am J Public Health,** v. 84, p. 1261-1264, 1994.

ESPADA, S.; ROJO, A.I.; SALINAS, M.; CUADRADO, A. The muscarinic M1 receptor activates Nrf2 through a signaling cascade that involves protein kinase C and inhibition of GSK-3beta: connecting neurotransmission with neuroprotection. **J Neurochem, v.** 110, n. 3, p. 1107-1119, 2009.

FAKHOURY, M.; Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. **Curr Neuropharmacol**, vol. 16, p. 508–518, 2018.

FAN, L.; MAO, C.; HU, X. et al. New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Front Neurol**, v. 10, p. 1312, 2020.

FARAJI, J. et al. Rats with hippocampal lesion show impaired learning and memory in the ziggurat task: a new task to evaluate spatial behavior. *Behav Brain Res*, v. 189, p. 17–31, 2008.

FERNÁNDEZ-CABEZUDO, M.J.; GEORGE, J.A.; BASHIR, G. et al. Involvement of Acetylcholine Receptors in Cholinergic Pathway-Mediated Protection Against Autoimmune Diabetes. **Front Immunol**, v. 10, p. 1038, 2019.

FERREIRA, S.T.; LOURENCO, M.V.; OLIVEIRA, M.M.; DE FELICE F.G. Soluble amyloid-β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 191, 2015.

FERREIRA-VIEIRA, T.H.; GUIMARAES, I.M.; SILVA, F.R.; RIBEIRO, F.M. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. **Curr Neuropharmacol**, v. 14, p. 101–115, 2016.

FOLCH, J.; ETTCHETO, M.; PETROV, D.; ABAD, S.; PEDRÓS, I. et al. Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: Strategies for combating  $\beta$ -amyloid protein. **Neurologia**, v. 33, p. 47-58, 2018.

MATTSON, M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631-639, 2004.

FRATINI, F.; CILIA, G.; MANCINI, S.; FELICIOLI, A. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. **Microbiol Res**, v. 192, p. 130-141, 2016.

FRINCHI, M.; NUZZO, D.; SCADUTO, P.; DI CARLO, M.; MASSENTI, M.F.; BELLUARDO, N.; MUDÒ, G. Anti-inflammatory and antioxidant effects of muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) activation in the rat hippocampus. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 14233, 2019.

FROST, G.R.; JONAS, L.A.; LI, Y.M. Friend, Foe or Both? Immune Activity in Alzheimer's Disease. **Front Aging Neurosci, v.** 11, p. 1-54, 2019.

FROZZA, R.L.; LOURENCO, M.V.; DE FELICE, F.G. Challenges for Alzheimer's Disease Therapy: Insights from Novel Mechanisms Beyond Memory Defects. **Front Neurosci**, v. 12, p. 37, 2018.

FUSTER-MATANZO, A.; LLORENS-MARTÍN, M.; HERNÁNDEZ, F.; AVILA, J. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. **Mediadores Inflamm,** v. 2013:260925, p. 1-20, 2013.

GIBBONS, A.; DEAN, B. The Cholinergic System: An Emerging Drug Target for Schizophrenia. **Curr Pharm Des, v.** 22, p. 2124-2133, 2016.

GILMAN, S.; KOLLER, M.; BLACK, R.S. et al. AN1792(QS-21)-201 Study Team. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. **Neurology**, v. 64, p. 1553-1562, 2005.

GOEDERT, M.; Oskar Fischer and the study of dementia. **Brain,** v. 132, p. 1102–1111, 2009.

GOEKOOP, R.; SCHELTENS, P.; BARKHOF, F.; ROMBOUTS, SA. Cholinergic challenge in Alzheimer patients and mild cognitive impairment differentially affects hippocampal activation--a pharmacological fMRI study. **Brain**, v. 129(Pt 1), p. 141-157, 2006.

GOMBART, A.F. et al. A review of micronutrients and the immune System–working in harmony to reduce the risk of infection. **Nutrients**, v. 12, p. 236, 2020.

GOMES, F.C.A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados,** v. 27, p. 61-84, 2013.

GREEN, K.N.; SMITH, I.F.; LAFERLA, F.M. Role of calcium in the pathogenesis of Alzheimer's disease and transgenic models. **Subcell Biochem,** v. 45, p. 507-521, 2007.

GRIEB, P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. **Molecular Neurobiology,** v. 53, p. 1741-1752, 2016.

GROSSBERG, G.T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Curr Ther Res Clin Exp,** v. 64, p. 216-235, 2003.

GRÜNEWALD, B.; SIEFERT, P. Acetylcholine and Its Receptors in Honeybees: Involvement in Development and Impairments by Neonicotinoids. **Insects**, v. 10, n. 12, p. 420, 2019.

GU, H.; SONG, I.B.; HAN, H.J. et al. Antioxidant Activity of Royal Jelly Hydrolysates Obtained by Enzymatic Treatment. **Korean J Food Sci Anim Resour**, v. 38, p. 135– 142, 2018.

GULISANO, W.; MAUGERI, D.; BALTRONS, M.A. et al. Role of Amyloid-β and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade. **J Alzheimers Dis**, v. 64, p. S611-S631, 2018.

GUO, Q.; HE, Z. Prediction of the confirmed cases and deaths of global COVID-19 using artificial intelligence. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 28, p. 11672-11682, 2021.

GUO, H.; KOUZUMA, Y.; YONEKURA, M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. **Food Chemistry, v.** 113, p. 238–245, 2009.

GUPTA, A.; SHARMA, A.; KUMAR, A.; GOYAL, R. Alteration in memory cognition due to activation of caveolin-1 and oxidative damage in a model of dementia of Alzheimer's type. **Indian J Pharmacol**, v. 51, p. 173–180, 2019.

HABASHY, N.H.; ABU-SERIE, M.M. Major royal-jelly protein 2 and its isoform X1 are two novel safe inhibitors for hepatitis C and B viral entry and replication. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 141, p. 1072–1087, 2019.

HABASHY, NH.; ABU-SERIE, MM. The potential antiviral effect of major royal jelly protein2 and its isoform X1 against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Insight on their sialidase activity and molecular docking. **J Funct Foods**, v. 75, p. 104282, 2020.

HAGA, K.; KRUSE. A.C.; Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. **Nature**, v. 482, p. 547-551, 2012.

HAILER, N.P.; WIRJATIJASA, F.; ROSER, N.; HISCHEBETH, G.T.; KORF, H.W.; DEHGHANI, F. Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in
organotypic hippocampal slice cultures. Eur J Neurosci, v, 14, p. 315–326, 2001.

HALL, J.M. et al. Receptor subtypes or species homologues: relevance to drug discovery. **Trends Pharmacol Sci**, v. 14, p. 376-383, 1993.

HAMPEL, H. et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain,** v. 141, n. 7, p. 1917–1933, 2018.

HAMPEL, H.; VERGALLO, A.; AGUILAR, L.F. et al. Alzheimer Precision Medicine Initiative (APMI). Precision pharmacology for Alzheimer's disease. **Pharmacol Res**, v. 130, p. 331-365, 2018.

HAN, X.; KUBOTA, I, et al. Muscarinic cholinergic regulation of cardiac myocyte ICa-L is absent in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci USA,** v. 95, p. 6510-6515, 1998.

HANSEN, D.V.; HANSON, J.E.; SHENG, M. Microglia na doença de Alzheimer. **J** Cell Biol, vol. 217, p. 459–472, 2018.

HARDY JA, HIGGINS GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, p. 184-185, 1992.

HATTORI, N. et al. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. **Biomed. Res.** v. 28, n. 5, p. 261–266, 2007.

HATTORI, N.; NOMOTO, H.; FUKUMITSU, H.; MISHIMA, S.; FURUKAWA, S. AMP N1-oxide potentiates astrogenesis by cultured neural stem/progenitor cells through STAT3 activation. **Biomed Res**, v. 28, p. 295–299, 2007.

HATTORI, N. et al. AMP N1-oxide, a unique compound of royal jelly, induces neurite outgrowth from PC12 vells via signaling by protein kinase A independent of that by mitogen-activated protein kinase. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** v. 7, p. 63-68, 2010.

HAVEKES, R.; ABEL, T. et al. The cholinergic system and neostriatal memory functions. **Behav Brain Res,** v. 221, p. 412-423, 2011.

HENEKA, M.T.; CARSON, M.J.; EL KHOURY, J. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. Lancet Neurol, v. 14, p. 388–405, 2015.

HONDA, Y.; ARAKI, Y.; HATA, T.; ICHIHARA, K.; ITO, M.; TANAKA, M. et al. 10hydroxy-2-decenoic acid, the major lipid component of royal jelly, extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through dietary restriction and target of rapamycin signaling. **J. Aging Res, v. 2015**, p. 1-14, 2015.

HUANG, P. et al. Use of chest CT in combination with negative RT-PCR assay for the 2019 novel coronavirus but high clinical suspicion. **Radiology**, v. 295, p. 22–23, 2020.

HULME, E.C.; BIRDSALL, J.M.; BUCKLEY, N.J. Muscarinic receptor subtypes. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, *v.* 30, p. 633–673, 1990.

HULME, E.C.; CURTIS, C.A. et al. The role of charge interactions in muscarinic agonist binding, and receptor-response coupling. **Life Sci**, v. 56, p. 891-898, 1995.

HUSNA, I.N.; YAHAYA, M.F.; et al. Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Seeking Clarity in a Time of Uncertainty. **Front Pharmacol**, v. 11, p. 261, 2020.

INGLIS, F. The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. **Int J Clin Pract Suppl,** v. 127, p. 45-63, 2002.

IOANNIDIS, J.; AXFORS, C. Population-level COVID-19 mortality risk for non-elderly individuals overall and for non-elderly individuals without underlying diseases in pandemic epicenters. **medRxiv**, 2020.

ITO H. Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1. **J. Neurosci. Res.** v. 71, p. 648–658, 2003.

ITO, S. et al. Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-trans-2-decenoic Acid, a unique unsaturated Fatty Acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model. **Evid Based Complement Alternat Med,** v. 2012, p. 139140, 2012. Jelly: A Review. **J Diet Suppl,** v. 13, p. 757-775, 2017.

JACK, C.R.JR.; KNOPMAN, D.S.; JAGUST, W.J. et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. **Lancet Neurol**, v. 12, p. 207–216, 2013.

JIANG, S. et al. M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. **Neurosci Bull**, v. 30, n. 2, p. 295-307, 2014.

JOLIVALT, C.G.; HURFORD, R.; LEE, C.A. et al. Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. **Exp Neurol**, v. 223, n. 2, p. 422–431, 2010.

KABIR, M.T.; UDDIN, M.S.; MAMUN, A.A. et al. Combination Drug Therapy for the Management of Alzheimer's Disease. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 9, p. 3272, 2020.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473 p. 478–83, 2011.

KAMETANI, F.; HASEGAWA, M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. **Front Neurosci**, v. 12, p. 25, 2018.

KANDIMALLA, R.; THIRUMALA, V.; REDDY, P.H. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis,** v. 1863 p. 1078–1089, 2017.

KARTHIKEYAN, A.; PATNALA, R.; JADHAV, S.P.; ENG-ANG, L.; DHEEN, S.T. MicroRNAs: Key Players in Microglia and Astrocyte Mediated Inflammation in CNS Pathologies. **Curr Med Chem,** v. 23, p. 3528–3546, 2016.

KARVE, I.P.; TAYLOR, J.M.; CRACK, P.J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. **Br J Pharmacol**, v. 173, p. 692–702, 2016.

KATZMAN, R.; TERRY, R.; KASHIMA Y.; KANEMATSU, S. et al. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. **Ann Neurol**, v. 23, p. 138-144, 1988.

KASHIMA, Y. et al. Identification of a novel hypocholesterolemic protein, major royal jelly protein 1, derived from royal jelly. **PLoS ONE**, v. 9, p. 105073, 2014.

KESSLER, P.; MARCHOT, P.; SILVA, M.; SERVENT, D. The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions. **J Neurochem,** v. 142, n. 2 p. 7-18, 2017.

KHAN, K.M.; DRESCHER, M.J. et al. Muscarinic receptor subtypes are differentially distributed in the rat cochlea. **Neuroscience**, v. 111, p. 291–302, 2002.

KHAZAEI, M.; ANSARIAN, A.; GHANBARI, E. New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review. *J Diet Suppl*, v.15, p. 757–775, 2018.

KOÇ, AN. Antifungal activity of the honeybee products against Candida spp. and Trichosporon spp. **J Med Food**, v. 14, p. 128-34, 2011.

MALEKI, V.; JAFARI-VAYGHAN, H.; SALEH-GHADIMI, S. et al. Effects of Royal jelly on metabolic variables in diabetes mellitus: A systematic review. **Complement Ther Med**, v. 43, p. 20–27, 2019.

KILLIN, L.O.; STARR, J.M.; SHIUE, I.J.; RUSS, T.C. Environmental risk factors for dementia: a systematic review. **BMC Geriatr**, v. 16, n. 1, p. 175, 2016.

KIM, G.H.; KIM, J.E.; RHIE, S.J.; YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Exp Neurobiol**, v. 24, p. 325–340, 2015.

KIM, J.H.; MIN, K.J.; SEOL, W.; JOU, I.; JOE, E.H. Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. **J Neurochem, v.** 115, p. 1161–1171, 2010.

KNIERIM, J.J. The hippocampus. Curr Biol. v. 25, p. 1116-1121, 2015.

KOCAHAN, S.; DOGAN, Z. Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: the brain, neural pathology, N-methyl-D-aspartate receptors, tau protein and other risk factors. **Clin. Psychopharmacol. Neurosci,** v. 15, p.1–8, 2017.

KOCOT, J.; KIEŁCZYKOWSKA, M.; LUCHOWSKA-KOCOT, D.; KURZEPA, J.;

MUSIK, I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. **Oxid Med Cell Longev.** v. 2018, p. 1-50, 2018.

KONAR, A.; GUPTA, R.; SHUKLA, R.K. et al. M1 muscarinic receptor is a key target of neuroprotection, neuroregeneration and memory recovery by i-Extract from Withania somnifera. **Sci Rep,** v. 9, n. 1, p. 13990, 2019.

KORÁBEČNÝ, J.; NEPOVIMOVÁ, E. et al. Newly Developed Drugs for Alzheimer's Disease in Relation to Energy Metabolism, Cholinergic and Monoaminergic Neurotransmission. **Neuroscience,** v. 1, n. 370, p. 191-206, 2018.

KOZLOV, S.; AFONIN, A.; EVSYUKOV, I.; BONDARENKO, A. Alzheimer's disease: as it was in the beginning. **Rev Neurosci**, v. 28, p. 825-843, 2017.

KRAFFT, G.A.; KLEIN, W.L. ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 59, p. 230-242, 2010.

KRUSE, A.C.; HU, J. et al. Muscarinic acetylcholine receptor X-ray structures: potential implications for drug development. **Curr Opin Pharmacol**, v. 16, p. 24-30, 2014.

KUBO, T.; FUKUDA, K. et al. et al. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. **Nature**, v. 323, p. 411-416, 1986.

KUBO, T.; MAEDA, A. et al. Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. **FEBS Lett,** v. 209, p. 367-372, 1986.

KUDLAK, M.; TADI, P. Physiology, Muscarinic Receptor. **StatPearls [Internet].** Treasure Island (FL), 2021. Disponível em: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555909/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555909/</a>>. Acesso em 10 mar. 2021.

KUHL, D.E.; MINOSHIMA, S.; FESSLER J.Á. et al. In vivo mapping of cholinergic terminals in normal aging, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 40, n. 3, p. 399-410,1996.

KUNUGI, H.; MOHAMMED ALI, A. Royal Jelly and Its Components Promote Healthy Aging and Longevity: From Animal Models to Humans. **Int J Mol Sci, v.** 20, p. 1-39, 2019.

LANE, C.A.; HARDY, J.; SCHOTT, J.M. Alzheimer's disease. **Eur. J. Neurol,** v.25, p.59-70, 2018.

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

LANZAFAME, A.A. et al. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. **Recept Channels**, v. 9, p. 241-260, 2003.

LEBOIS, E.P.; SCHROEDER, J.P.; ESPARZA, T.J. et al. Disease-Modifying Effects of M<sub>1</sub> Muscarinic Acetylcholine Receptor Activation in an Alzheimer's Disease Mouse Model. **ACS Chem Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 1177-1187, 2017.

LEBOIS, E.P.; THORN, C.; EDGERTON, J.R.; POPIOLEK, M.; XI, S. Muscarinic receptor subtype distribution in the central nervous system and relevance to aging and Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 1, n. 136, p. 362-373, 2018.

LEVEY, A.I. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. **Life Sci**, v. 52, n. 5-6, p. 441-448, 1993.

LEVEY, A.I. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 24, p. 13541-13546, 1996.

LIAO, C.F. et al. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. **J Biol Chem,** v. 264, p. 7328-7337, 1989.

LIDDELOW, S.A.; GUTTENPLAN, K.A.; CLARKE, L.E. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, p. 481–487, 2017.

LILLY. Lilly announces top-line results of Solanezumab phase 3 clinical trial, 2016. Disponível em: <a href="https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lilly-announces-top-line-results-solanezumab-phase-3-clinical>">https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lilly-announces-top-line-results-solanezumab-phase-3-clinical>">https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lilly-announces-top-line-results-solanezumab-phase-3-clinical>">https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lilly-announces-top-line-results-solanezumab-phase-3-clinical>">https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lilly-announces-top-line-results-solanezumab-phase-3-clinical>">https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lilly-announces-top-line-results-solanezumab-phase-3-clinical>">https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lilly-announces-top-line-results-solanezumab-phase-3-clinical>">https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lilly-announces-top-line-results-solanezumab-phase-3-clinical>">https://investor.lilly.com/news-releases/news-r

LIMA, WG. Bee products as a source of promising therapeutic and chemoprophylaxis strategies against COVID-19 (SARS-CoV-2). **Phytother Res**, v. 35, p. 743-750, 2021.

LIN, Y.; SHAO, Q.; ZHANG, M. ET AL. Royal jelly-derived proteins enhance proliferation and migration of human epidermal keratinocytes in an in vitro scratch wound model. **BMC Complement Altern Med**, v. 19, n. 1, p. 175, 2019.

LIU, J.R.; YANG, Y.C.; SHI, L.S. et al. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 23, p. 11447-11452, 2008.

LIU, P.; ZOU, L.B.; WANG, L.H. et al. Xanthoceraside attenuates tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in intracerebroventricular-streptozotocin injected rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, p. 345–356, 2014.

LUEPTOW, L.M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **J Vis Exp,** v. 126, p. 1-17, 2017.

MAGISTRETTI, P.J.; ALLAMAN, I. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. **Neuron,** v. 86, p. 883–901, 2015.

MAJKUTEWICZ, I.; KUROWSKA, E. et al. Age-dependent effects of dimethyl fumarate on cognitive and neuropathological features in the streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **Brain Res**, v. 1, p. 19-33, 2018.

MASTERS, C.L.; BATEMAN, R.; ROWE C.C. et al. Alzheimer's disease. **Nat Rev Dis Primers,** v. 1, n. 15056, 2015.

MEDEIROS, R.; KITAZAWA, M.; CACCAMO, A. et al. Loss of muscarinic M1 receptor exacerbates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. **Am J Pathol**, v. 179, p. 980-991, 2011.

MISHRA, N.; SASMAL, D.; SINGH, K.K. Attenuating Aβ1-42-induced toxicity by a novel acetylcholinesterase inhibitor. **Neuroscience**, v. 250, p. 309-319, 2013.

MIYATA, Y.; SAKAI, H. Anti-Cancer and Protective Effects of Royal Jelly for Therapy-Induced Toxicities in Malignancies. **Int J Mol Sci, v.** 19, n. 3270, p. 1-26, 2018.

MOERTEL, C.G.; HANLEY, J.A.; JOHNSON, L.A. Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. **N Engl J Med,** v. 303, p. 1189-1194, 1980.

MOHAMED, A.A.; GALAL, A.A.; ELEWA, Y.H. Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. **Acta Histochem,** v. 117, p. 649–658, 2015.

MORAN, S.P.; MAKSYMETZ, J.; CONN, P.J. Targeting Muscarinic Acetylcholine Receptors for the Treatment of Psychiatric and Neurological Disorders. **Trends Pharmacol Sci**, v. 40, n. 12, p. 1006-1020, 2019.

MORIMOTO, K.; HORIO, J.; SATOH, H. et al. Expression profiles of cytokines in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients compared to the brains of non-demented patients with and without increasing AD pathology. **J Alzheimers Dis**, v. 25, p. 59–76, 2011.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J Neurosci Methods,** v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984.

MOSCONI, L. et al. Hippocampal Hypometabolism predicts cognitive decline from normal aging. **Neurobiology of aging,** v. 29, p. 676-692, 2008.

MOSES, S.N.; COLE, C.; RYAN, J.D. Relational memory for object identity and spatial location in rats with lesions of perirhinal cortex, amygdala and hippocampus. **Brain Res Bull**, v. 65, p. 501–512, 2005.

MUCKE, L.; SELKOE, D.J. Neurotoxicity of amyloid β-protein: synaptic and network dysfunction. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 7, p. a6338, 2012.

MUDDAPU, V.R. et al. Neurodegenerative Diseases - Is Metabolic Deficiency the Root Cause?. **Front Neurosci**, v. 14, p. 213, 2020.

MULUGETA, E.; KARLSSON, E. et al. Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. **Brain Res**, v. 960, p. 259-262, 2003.

MUREŞAN, C.I.; BUTTSTEDT, A. pH-dependent stability of honey bee (Apis mellifera) major royal jelly proteins. **Sci Rep**, v. 9, n. 9014, p. 1-13, 2019.

NAINU, F. et al. Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties. **Antibiotics (Basel)**, v. 10, p. 822, 2021.

NASER, P.V.; KUNER, R. Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. **Neuroscience**, v. 1, n. 387, p. 135-148, 2018.

NASH, M. S. et al. Synaptic activity augments muscarinic acetylcholine receptorstimulated inositol 1,4,5-trisphosphate production to facilitate Ca2+ release in hippocampal neurons. **J Biol Chem**, v. 279, n. 47, p. 4936-4944, 2004.

NITSCH, R.; HOYER, S. Local action of the diabetogenic drug, streptozotocin, on glucose and energy metabolism in rat brain cortex. **Neurosci Lett,** v. 128, n. 2, p. 199–202, 1991.

OKI, T. TAKAGI, Y. Quantitative analysis of binding parameters of [3H]Nmethylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 133, p. 6-11, 2005.

PAGE, R.E.; JR.; PENG, C.Y. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, Apis mellifera L. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 4-6, p. 695-711, 2001.

PAKRASI, S.; COLLOBY, S.J.; FIRBANK, M.J.; PERRY, E.K. et al. Muscarinic acetylcholine receptor status in Alzheimer's disease assessed using (R, R) 123I-QNB SPECT. **J Neurol**, v. 254, n. 7, p. 907-913, 2007.

PASUPULETI V.R. et al. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. **Oxid. Med. Cell.** v. 2017, p. 1259510, 2017.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, 1998. ISBN 9780125476195.

PEARSON, R.C. ET AL. Persistence of cholinergic neurons in the basal nucleus in a brain with senile dementia of the Alzheimer's type demonstrated by immunohistochemical staining for choline acetyltransferase. **Brain Res**, v. 289, p. 375-379, 1983.

PERALTA, E.; ASHKENAZI, A. et al. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. **Nature**, v. 334, p. 434-437, 1988.

PORTER, A. C. et al. M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. **Brain Res**, v. 944, n. 1-2, p. 82-89, 2002.

POWER, J.M.; SAH, P. Nuclear calcium signaling evoked by cholinergic stimulation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **J.Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 3454-3462, 2002.

PRENDECKI, M.; KOWALSKA, M.; TOTON, E.; KOZUBSKI, W. Genetic Editing and Pharmacogenetics in Current and Future Therapy Of Neurocognitive Disorders. **Curr Alzheimer Res**, v. 17, p. 238-258, 2020.

QUIRION, R. Cholinergic markers in Alzheimer disease and the autoregulation of acetylcholine release. **J Psychiatry Neurosci**, v. 18, p. 226-234, 1993.

RAFFA, R.B. The M5 muscarinic receptor as possible target for treatment of drug abuse. **J Clin Pharm Ther, v.** 34, p. 623-629, 2009.

RAINA, P.; SANTAGUIDA, P. et al. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. **Ann Intern Med,** v. 148, p. 379-397, 2008.

RAMANATHAN, A.N.K.G.; NAIR A.J.; SUGUNAN, V.S. A review on Royal Jelly proteins and peptides. **Journal of Functional Foods,** v. 44, p. 255-264, 2018.

RAMOS, J.M.; CARVALHO, N.C. Estudo Morfológico e Biológico das Fases de Desenvolvimento de Apis mellifera. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE ENGENHARIA FLORESTAL,** Ano VI, n. 10, 2007.

RAVELLI, K.G.; ROSÁRIO, B.D.; CAMARINI, R.; HERNANDES, M.S.; BRITTO L.R. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. **Neurotox Res, v.** 31, p. 327–333, 2017.

REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 3, p. 137-152, 2011.

RICCIARELLI, R.; FEDELE, E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. **Curr Neuropharmacol,** v. 15, p. 926-935, 2017.

ROBINSON, S.R.; BISHOP, G.M.; LEE, H.G.; MÜNCH, G. Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. **Neurobiol Aging**, v. 25, p. 609-615, 2004.

RODRÍGUEZ-ARELLANO, J.J.; PARPURA, V.; ZOREC, R.; VERKHRATSKY, A. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. **Neuroscience,** v. 323, p. 170–182, 2016.

RODRIGUEZ-DIAZ, R.; DANDO, R. et al. Alpha cells secrete acetylcholine as a nonneuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. **Nat Med**, v. 17, p. 888-892, 2011.

RODRÍGUEZ-PUERTAS, R.; PASCUAL, J. et al. Autoradiographic distribution of M1, M2, M3, and M4 muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease. **Synapse**, v. 26, n. 4, p. 341-350, 1997.

ROSAS-BALLINA. M.; OLOFSSON, P.S.; OCHANI, M. et al. Acetylcholinesynthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science**, v. 334, p. 98-101, 2011.

ROSENBERG, P.B.; NOWRANGI, M.A.; LYKETSOS, C.G. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: What might be associated brain circuits?. **Mol Aspects Med,** v. 43-44, p. 25-37, 2015.

ROSENBERGER, A.F.; HILHORST, R.; COART, E. et al. Protein Kinase Activity Decreases with Higher Braak Stages of Alzheimer's Disease Pathology. **J Alzheimers Dis,** v. 49, p. 927-943, 2016.

ROSTAMI, F.; JAVAN, M.; MOGHIMI, A.; HADDAD-MASHADRIZEH, A.; FEREIDONI M. Streptozotocin-induced hippocampal astrogliosis and insulin signaling malfunction as experimental scales for subclinical sporadic Alzheimer model. **Life Sci**, v. 188, p. 172–185, 2017.

ROY, A.; DAKROUB, M. et al. Cardiac acetylcholine inhibits ventricular remodeling and dysfunction under pathologic conditions. **FASEB J**, v. 30, p. 688-701, 2016.

SALLOWAY, S.; SPERLING, R.; FOX, N.C.; BLENNOW, K. et al. Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 370, n. 4, p. 322-333, 2014.

SANTOS, D.B.; COLLE, D.; MOREIRA, E.L. et al. Probucol mitigates streptozotocininduced cognitive and biochemical changes in mice. **Neuroscience**, v. 284, p. 590– 600, 2015.

SARLUS, H.; HENEKA, M.T. Microglia in Alzheimer's disease. **J Clin Invest, v.** 127, p. 3240–3249, 2017.

SAWIKR, Y.; YARLA, N.S.; PELUSO, I.; KAMAL, M.A.; ALIEV, G.; BISHAYEE, A. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: The Preventive and Therapeutic Potential of Polyphenolic Nutraceuticals. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 108, p. 33–57, 2017.

SCARR, E. Muscarinic receptors: their roles in disorders of the central nervous system and potential as therapeutic targets. **CNS Neurosci Ther,** v. 18, n. 5, p. 369-379, 2012.

SCARR, E.; MCLEAN, C.; DEAN, B. Higher levels of different muscarinic receptors in the cortex and hippocampus from subjects with Alzheimer's disease. **J Neural Transm (Vienna),** v. 124, p. 273-284, 2017.

SCHINDOWSKI, K.; BELARBI, K.; BUÉE, L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. **Genes Brain Behav,** v. 7, Suppl 1, n. 1, p. 43-56, 2008.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 113, n. 11, p. 1625-1644, 2006.

SCHNEIDER.; CAROLINE, A et al. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." **Nature methods**, vol. 9-7, n. 671-5, 2012. doi:10.1038/nmeth.2089

SCORZA, F.A. et al. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. **Arq. Neuro-Psiquiatr,** v. 63, n. 2a, p. 283-288, 2005.

SELKOE, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev,** v. 81, p. 741-66, 2001.

SHAHIDI, S.; HASHEMI-FIROUZI, N.; AFSHAR, S.; ASL, SS.; KOMAKI, A. Protective Effects of 5-HT1A Receptor Inhibition and 5-HT2A Receptor Stimulation Against Streptozotocin-Induced Apoptosis in the Hippocampus. **Malays J Med Sci**, v. 26, p. 40-51, 2019.

SHAKOOR, H. et al. Immune-boosting role of vitamins D, C, E, zinc, selenium and omega-3 fatty acids: Could they help against COVID-19?. **Maturitas**, v. 143, p. 1-9, 2021.

SHIOZAKI, K. et al. Alterations of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in diffuse lewy body disease: relation to Alzheimer's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 209-13, Aug 1999.

SHORTER, J.R.; GEISZ, M.; ÖZSOY, E.; MAGWIRE, M.M.; CARBONE, M.A.; MACKAY, T.F. The Effects of Royal Jelly on Fitness Traits and Gene Expression in Drosophila melanogaster. *PLoS One*, v. 10, n. 0134612, p. 1-14, 2015.

SIAVASH, M.; SHOKRI, S.; HAGHIGHI, S.; MOHAMMADI, M.; SHAHTALEBI, MA.; FARAJZADEHGAN, Z. The efficacy of topical Royal Jelly on diabetic foot ulcers healing: A case series. **J Res Med Sci**, v. 16, p. 904–909, 2011.

SILVA, M.F.P.; ALVES, P.L.; ALPONTI, R.F.; SILVEIRA, P.F.; ABDALLA, F.M.F. Effects of obesity induced by high-calorie diet and its treatment with exenatide on muscarinic acetylcholine receptors in rat hippocampus. **Biochem Pharmacol**, v. 169, n. 113630, 2019.

SILVA, T.G,S. et al. Oral treatment with royal jelly improves memory and presents neuroprotective effects on icv-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease. **Helyon,** v. 6, n. e03281, 2020.

SILVA, T.G.S. Avaliação de efeitos neuroprotetores e comportamentais do tratamento com geleia real em ratos Wistar submetidos à administração intracerebroventricular de estreptozotocina, um modelo da doença de Alzheimer esporádica. 143 f. Dissertação (Mestrado – em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SIMUTH, J.; BILIKOVA, K.; KOVACOVA, E.; KUZMOVA, Z.; SCHRODER, W. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF-alpha release is a regular component of honey. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 2154–2158, 2004.

SMITH, M.A.C. Doença de Alzheimer. Rev Br Psiq, v.21, p. 3-7, 1999.

SODHI, R.K.; SINGH, N. Defensive effect of lansoprazole in dementia of AD type in mice exposed to streptozotocin and cholesterol enriched diet. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70487, 2013.

SONKUSARE, S.; SRINIVASAN, K.; KAUL, C.; RAMARAO, P. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **Life Sci**, v. 77, n. 1, p. 1–14, 2005.

SORIAL, M.E, EL SAYED. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 390, n. 6, p. 581-593, 2017.

SPILOVSKA, K.; KORABECNY, J.; NEPOVIMOVA, E. et al. Multitarget Tacrine Hybrids with Neuroprotective Properties to Confront Alzheimer's Disease. **Curr Top Med Chem,** v. 17, p. 1006-1026, 2017.

SREEPADMANABH, M. et al. COVID-19: Advances in diagnostic tools, treatment strategies, and vaccine development. **J Biosci**, v. 45, p. 148, 2020.

SUGIYAMA, T.; TAKAHASHI, K.; TOKORO, S.; GOTOU, T.; NERI, P.; MORI, H. Inhibitory effect of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid on LPS-induced IL-6 production via reducing IkappaB-zeta expression. **Innate Immun**, *v*. 18, p. 429–437, 2012.

SUN, Y.; MA, C.; SUN, H. et al. Metabolism: A Novel Shared Link between Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease. **J Diabetes Res**, v. 2020, p. 4981814, 2020.

SWERDLOW, R.H. et al. The Alzheimer's diseasemitochondrial cascada hyphotesis. **Journal of Alzheimer's Disease,** v. 20, p. 265-279, 2010.

TAYEBATI, S.K. et al. Localization of the m5 muscarinic cholinergic receptor in rat circle of Willis and pial arteries. **Neuroscience**, v. 122, p. 205-211, 2003.

TEIXEIRA, R.R.; DE SOUZA, A.V.; PEIXOTO, L.G. et al. Royal jelly decreases corticosterone levels and improves the brain antioxidant system in restraint and cold stressed rats. **Neurosci Lett**, v. 655, p. 179–185, 2017.

TING JI. et al. Proteomics analysis reveals protein expression differences for hypopharyngeal gland activity in the honeybee, *Apis mellifera carnica* Pollmann. **BMC Genomics**, v. 15, n. 665, 2014.

TSANG, S.W.; FRANCIS P.T. et al. Loss of [3H]4-DAMP binding to muscarinic receptors in the orbitofrontal cortex of Alzheimer's disease patients with psychosis. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 198, p. 251-259, 2008.

TUMMINIA, A.; VINCIGUERRA, F.; PARISI, M. et al. Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease: role of insulin signalling and therapeutic implications. **Int. J. Mol. Sci,** v. 19, n. 3306, p. 1-17, 2018.

VENTURA, A.L.M.; ABREU, P.A. et al. Colinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Rev Psiq Clín**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

VERMA, S.; KUMAR, A.; TRIPATHI, T.; KUMAR, A. Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists: current scenario in Alzheimer's disease therapy. **J Pharm Pharmacol**, v. 70, p. 985-993, 2018.

VILLEMAGNE, V.L.; PIKE, K.E. et al. Longitudinal assessment of Aβ and cognition in aging and Alzheimer disease. **Ann Neurol**, v. 69, p. 181-192, 2011.

WANG, H.; HAN, H.; ZHANG, L. et al. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. **Mol. Pharmacol,** v. 59, p. 1029–1036, 2001.

WANG, H.Y.; FRIEDMAN, E. Receptor-mediated activation of G proteins is reduced in postmortem brains from Alzheimer's disease patients. **Neurosci Lett,** v. 173, p. 37-39, 1994.

WANG, S.Z.; ZHU, S.Z., MASH, D.C.; EL-FAKAHANY, E.E. Comparison of the concentration of messenger RNA encoding four muscarinic receptor subtypes in control and Alzheimer brains. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 16, p. 64-70, 1992.

WANG, W.Y.; TAN, M.S. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. **Ann Transl Med,** v. 3, n. 136, p. 1-26, 2015.

WANG, X.; ZHENG, W.; XIE, J.W.; WANG, T. et al. Insulin deficiency exacerbates cerebral amyloidosis and behavioral deficits in an Alzheimer transgenic mouse model. **Mol Neurodegener**, v. 5, p. 46, 2010b.

WEISER, M.J. et al. Long-Term Administration of Queen Bee Acid (QBA) to Rodents Reduces Anxiety-Like Behavior, Promotes Neuronal Health and Improves Body Composition. **Nutrients**, v. 10, n. 1, p. 13, 2017.

WELT, T.; KULIC, L. et al. Acute Effects of Muscarinic M1 Receptor Modulation on A $\beta$ PP Metabolism and Amyloid- $\beta$  Levels in vivo: A Microdialysis Study. **J Alzheimers Dis**, v. 46, p. 971-982, 2015.

WESS, J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. **Trends Pharmacol Sci, v.** 14, p. 308-313, 1993.

WESS, J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. **Crit Rev Neurobiol**, v. 10, p. 69-99, 1996.

WESS, J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** v. 44, p. 423-450, 2004. WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C.J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 8, p. 1558-1571, 2008.

WESSLER, I.K.; KIRKPATRICK, C.J. Non-neuronal acetylcholine involved in reproduction in mammals and honeybees. **J Neurochem**, v. 142, p. 114-150, 2017.

WESTFALL, T.C.; WESTFALL, D.P. Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous system. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th ed. Edited by L Bruton. New York: McGraw Hill, p. 171-218, 2011.

WHITEHOUSE, P.J. et al. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. **Ann. Neurol**, v. 10, p. 122–126, 1981.

WILLETS, J.M. et al. Imaging of muscarinic acetylcholine receptor signaling in hippocampal neurons: evidence for phosphorylation-dependent and -independent regulation by G-protein-coupled receptor kinases. **J Neurosci,** v. 24, n. 17, p. 4157-4162, 2004.

WINSLOW, B.T.; ONYSKO, M.K.; STOB, C.M.; HAZLEWOOD, K.A. Treatment of Alzheimer disease. **Am Fam Physician**, v. 83, p. 1403-1412, 2011. Erratum in: **Am Fam Physician**, v. 90, p. 209, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dementia: a public health priority. **World Health Organization (2012),** Disponível em <a href="https://apps.who.int/iris/handle/10665/75263">https://apps.who.int/iris/handle/10665/75263</a>. Acesso em 19 de abril. 2021.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). coronavirus disease 2019 (covid-19) situation report–28, Disponível em <<u>https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200217-sitrep-28-covid-19.pdf?sfvrsn=a19cf2ad\_2</u>>. Acesso em de 30 julho de 2021.

WU, P.; HONG, S.; ZHONG, M. et al. Effect of Sodium Valproate on Cognitive Function and Hippocampus of Rats After Convulsive Status Epilepticus. **Med Sci Monit,** v. 22, p. 5197–5205, 2016.

XAVIER, G.F.; OLIVEIRA-FILHO, F.J.; SANTOS, A.M. 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**, v. 9, n. 6, p. 668-681, 1999.

XIN, R.; CHEN, Z.; FU, J.; SHEN, F.; ZHU, Q.; HUANG, F. Xanomeline Protects Cortical Cells From Oxygen-Glucose Deprivation via Inhibiting Oxidative Stress and Apoptosis. **Front Physiol**, v. 11, p. 656, 2020.

YAMADA, M.; MIYAKAWA, T. et al. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. **Nature,** v. 410, p. 207-212, 2001.

YI, J.H.; WHITCOMB, D.J. et al. M1 muscarinic acetylcholine receptor dysfunction in moderate Alzheimer's disease pathology. **Brain Communications,** v. 2, n. 2, fcaa058, 2020.

YOU, M.; MIAO, Z.; PAN, Y.; HU, F. Trans-10-hydroxy-2-decenoic acid alleviates LPS-induced blood-brain barrier dysfunction by activating the AMPK/PI3K/AKT pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 865, n. 172736, 2019.

YOU, M.; MIAO, Z.; TIAN, J. et al. Trans-10-hydroxy-2-decenoic acid protects against LPS-induced neuroinflammation through FOXO1-mediated activation of autophagy. **Eur J Nutr**, v. 59, p. 2875–2892, 2019.

YOU, M.M.; CHEN, Y.F.; PAN, Y.M. et al. Royal Jelly Attenuates LPS-Induced Inflammation in BV-2 Microglial Cells through Modulating NF- $\kappa$ B and p38/JNK Signaling Pathways. **Mediators Inflamm**, v. 2018, n. 7834381, 2018.

ZENG, F.Y.; WESS, J. Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. **J Biol Chem**, v. 274, p. 19487–19497, 1999.

ZHANG, J.; YAKOVLIEVA, L.; DE HAAN, B.J. et al. Selective Modification of Streptozotocin at the C3 Position to Improve Its Bioactivity as Antibiotic and Reduce Its Cytotoxicity towards Insulin-Producing  $\beta$  Cells. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 4, p.182, 2020.

ZHAO, Y.; LI, Z.; TIAN, W. et al. Differential volatile organic compounds in royal jelly associated with different nectar plants. **Journal of Integrative Agriculture,** v. 15, n. 5, p. 1157–1165, 2016.

ZHU, X. et al. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. **Virus Res,** v. 285, p. 198005, 2020.

ZHU, F.C. et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: A dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. **The Lancet**, v. 395, p. 1845–1854, (2020a).