



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALEXANDER VASCONCELOS BUZAGLO

**ESTUDO SOBRE O EFEITO NEUROPROTETOR DE CAFEÍNA EM MODELO
ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

FORTALEZA

2022

ALEXANDER VASCONCELOS BUZAGLO

**ESTUDO SOBRE O EFEITO NEUROPROTETOR DE CAFEÍNA EM MODELO
ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Coordenação de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Ceará como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Geanne Matos de Andrade
Co-Orientadora: Me. Jéssica Rabelo Bezerra

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B93e Buzaglo, Alexander Vasconcelos.
Estudo sobre o efeito neuroprotetor de cafeína em modelo animal de doença de Alzheimer induzida por estreptozotocina / Alexander Vasconcelos Buzaglo. – 2022.
59 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.
Coorientação: Profa. Ma. Jéssica Rabelo Bezerra.
1. Doença de Alzheimer esporádica. 2. Estreptozotocina. 3. Cafeína. 4. Glicose. 5. Ansiedade. I. Título.
CDD 570
-

ALEXANDER VASCONCELOS BUZAGLO

**ESTUDO SOBRE O EFEITO NEUROPROTETOR DE CAFEÍNA EM MODELO
ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Coordenação de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Ceará como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em 13/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Jéssica Rabelo Bezerra (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Cascon
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Ariádne Elisa Belo da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo eu agradeço a Deus, por tudo que Ele faz por mim, desde todas as suas bênçãos até quaisquer obstáculos e sofrimentos que compõem a estranha, porém valorosa aventura que é viver. É em Sua honra que todo amor e agradecimento provêm, pois tudo que é bom baseia-se em Deus—e da mesma forma desejo, por toda a minha vida, direcionar a adoração e gratidão a Deus, a quem elas pertencem.

Aos meus pais, Antonia Benedita Vasconcelos e Alexander Souza Buzaglo, não somente pela minha vida, mas também por todo o amor e cuidado que me proporcionam, pela educação que me oferecem, pelos ensinamentos que me dão, pela ajuda e companhia em todos os momentos, e por sempre acreditarem em mim. Não existem palavras suficientes em qualquer língua do mundo capazes de descrever o quanto eu os amo e a eles sou grato.

Aos meus avós, tios, irmãos e primos, bem como toda a minha família, por todas as bênçãos que eles representam na minha vida, e por sempre tê-los ao meu lado em tantas memórias inesquecíveis.

À Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade e Me. Jéssica Rabelo Bezerra, minha orientadora e co-orientadora, respectivamente, que muito me ajudaram neste trabalho e por terem contribuído para o meu aprendizado e formação, permitindo-me usufruir da sabedoria e conhecimento que elas com sacrifício e dedicação conquistaram.

Ao Prof. Dr. Paulo Cascon e Me. Ariádne Belo por aceitarem participar da minha banca examinadora, ao que me sinto muito honrado e grato.

À Dra. Tyciane de Souza Nascimento, que me instruiu e guiou desde o primeiro momento em que entrei no Laboratório de Neurociências e Comportamento, com admiráveis força, competência, paciência e dedicação.

Aos meus veteranos colegas Alfaete Vieira, Ariádne Belo e Jéssica Pessoa, por toda a sua ajuda, direcionamento e companheirismo.

Ao Fernando, Bianca, Rodrigo, Luana, Lucas, Rauébia, Leida, David e Davi, além de todos os meus outros colegas de Ciências Biológicas, de número maior do que existem páginas para citá-los. É difícil mesmo sonhar com melhores amigos, e eu agradeço por todos os maravilhosos momentos que eu tive a honra de experienciar com vocês.

À Me. Lilian Xavier, Dr. Paulo Cascon, Dra. Helena Cascon, e Dr. Vicente Vieira, pessoas de imensa importância para a minha formação e aprendizado, às quais eu agradeço imensamente por toda a instrução, experiência e aprendizado.

Aos meus mentores Professor Rui Martinho e Frei Hermínio Bezerra de Oliveira, pelos conselhos, incentivos e inspiração que me proporcionaram direcionamentos na minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal do Ceará (UFC) e o Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC), pelo apoio financeiro que permitiu este estudo ser realizado.

A todos os gigantes da Ciência e todas as outras maravilhas cultivadas pela mente humana, cujos nomes são imortais tais quanto suas almas.

A todos os camundongos cujos sacrifícios foram necessários para este projeto. Que este trabalho honre-os ao fazer com que suas mortes não tenham sido em vão.

**“Porque o Tempo destrói as ficções do erro e opinião,
enquanto confirma a determinação da Natureza e da
Verdade.” (MARCUS T. CICERO, *De Natura Deorum*)**

RESUMO

A Doença de Alzheimer é uma síndrome de distúrbios neuropatológicos neurodegenerativos de natureza crônica e progressiva, caracterizada pelo desenvolvimento de placas senis (ou amilóides), emaranhados neurofibrilares, neuritos distróficos e fios neuropilares, associados à déficits cognitivos e comportamentais. O modelo intracerebroventricular de Estreptozotocina constitui uma ferramenta efetiva para investigar tal doença, e é baseada em injeções intracerebroventriculares de Estreptozotocina, que causa a redução da captação de insulina no cérebro pela dessensibilização dos receptores de insulina e IGFs, além de outros efeitos, induzindo características moleculares, patológicas e comportamentais similares aos da Doença de Alzheimer. O objetivo deste estudo foi a investigação dos possíveis efeitos neuroprotetores da cafeína sobre este modelo experimental, medindo seus efeitos sobre a glicemia; atividade locomotora; memória de trabalho, de reconhecimento, e aversivas de curto e longo prazo. Para tal fim, 40 camundongos *Swiss Specific Pathogen Free* foram divididos igualmente em quatro grupos, onde os grupos 1 e 2 receberam injeção intracerebroventricular bilateral com Fluido Cérebro Espinhal Artificial, e os grupos 3 e 4 com Estreptozotocina (3mg/Kg, dividido entre os dois ventrículos). Os grupos 1 e 3 foram subsequentemente tratados por via oral com Veículo (água destilada), e os grupos 2 e 4 com Cafeína (15 mg/Kg), também por via oral. Dosagens de glicemia foram realizadas em todos os animais um dia anteriormente às cirurgias e também à eutanásia, de modo a confirmar que eles não estão diabéticos. Não foram evidenciadas alterações nos níveis de glicose antes ou depois da injeção intracerebroventricular de Estreptozotocina e com o tratamento da cafeína. Os animais não demonstraram deficiências locomotoras. A memória de trabalho dos animais não indicou alteração significativa. Os animais submetidos à injeção de Estreptozotocina apresentaram índice menor de reconhecimento, porém o tratamento com cafeína promoveu uma melhora significativa perante a tais déficits. Os animais submetidos a Estreptozotocina apresentaram déficits de memória tardia, porém os tratados com cafeína foram protegidos do declínio na memória recente e na memória tardia. Os diferentes grupos não apresentaram alterações significativas em relação à ansiedade e comportamentos ansiosos. De tal forma, a cafeína é capaz de proteger camundongos de déficits de memória induzidos pela administração intracerebroventricular de Estreptozotocina, e sugere-se um papel neuroprotetor da cafeína na perda cognitiva, podendo, portanto, servir como possível estratégia neuroprotetora e/ou adjuvante da Doença de Alzheimer.

Palavras-Chave: Doença de Alzheimer Esporádica. Estreptozotocina. Cafeína. Glicose. Ansiedade. Memória. Atividade Locomotora. Neuroproteção.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease is a syndrome of neuropathological neurodegenerative disruptions of a chronic and progressive nature, characterized by the development of senile plaques (or amyloid plaques), neurofibrillary tangles, dystrophic neurites and neuropil strands, associated with cognitive and behavioral deficits. The Streptozotocin model constitutes an effective tool for the investigation of the disease, and is based upon Intracerebroventricular injections of the drug Streptozotocin, which results in the reduction of the Insulin uptake via the desensitization of insulin receptors and IGFs, together with other effects, inducing the molecular, pathological and behavioral characteristics similar to those of Alzheimer's Disease. The aim of this study was the investigation of the possible neuroprotective effects of Caffeine over this experimental model, measuring its effects on glycemia; locomotor activity; working memory, recognition memory, and short- and long-term aversive memories. To that end, 40 Swiss Specific Pathogen Free mice were equally divided into four groups, wherein the groups 1 and 2 received Intracerebroventricular injection with Artificial Cerebrospinal Fluid, and the groups 3 and 4 received Streptozotocin (3mg/Kg). The groups 1 and 2 were subsequently treated orally with Vehicle (potable water), and the groups 2 and 4 with caffeine (15 mg/Kg), also orally. Glycemia dosage was performed in every animal one day before the surgeries and the euthanasia, so as to confirm that they were not diabetic. There was no evidence of alterations in the glucose levels before or after the Intracerebroventricular Streptozotocin injection or the caffeine treatment. The animals did not demonstrate locomotor deficiencies. There was no indication of a significant alteration in their working memory. The animals that underwent Streptozotocin injection presented a lower recognition index, however the treatment with caffeine promoted a significant improvement. The animals subjected to Streptozotocin displayed long-term memory deficits, however those treated with Caffeine were protected from such a decline in the short- and long-term memories. The different groups did not display significant alterations in regards to anxiety and anxious behaviors. In such a way, Caffeine is capable of protecting mice from memory deficits induced by the Intracerebroventricular administration of Streptozotocin, suggesting it to have a neuroprotective role against cognitive losses and being capable, therefore, of serving as a possible neuroprotective and/or adjuvant strategy against Alzheimer's Disease.

Key-Words: Sporadic Alzheimer's Disease. Streptozotocin. Caffeine. Glucose. Anxiety. Memory. Locomotor Activity. Neuroprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

A β	- Amilóide- β
APOE	- Apolipoproteína E
APP	- Proteína Precursora de Amilóide
aCSF	- Fluido Cérebro Espinhal artificial
CAF	- Cafeína
cAMP	- Adenosina Monofosfato cíclico
CCLA	- Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DA	- Doença de Alzheimer
DAE	- Doença de Alzheimer Esporádica
DAF	- Doença de Alzheimer Familiar
ENF	- Emaranhados Neurofibrilares
GFAP	- <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
ICV	- Injeção Intracerebroventricular
IGF	- Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
MAM	- Membranas Associadas à Mitocôndrias
MR	- Memória Recente
MT	- Memória Tardia
NPDM	- Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
PN	- Placas Neuríticas
PPBA	- Proteína Precursora de Beta Amilóide
SNC	- Sistema Nervoso Central
STZ	- Estreptozotocina
UFC	- Universidade Federal do Ceará
V	- Veículo

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Efeito do tratamento com a cafeína sobre a glicemia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por STZ	46
Gráfico 2	– Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) na atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ no teste do campo aberto	47
Gráfico 3	– Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) na atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ no teste do campo aberto	48
Gráfico 4	– Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) sobre a memória de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ	49
Gráfico 5	– Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) sobre a memória aversiva recente e tardia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ	50
Gráfico 6	– Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) sobre a memória aversiva recente e tardia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	A Doença de Alzheimer	16
<i>1.1.1</i>	<i>Definição da Doença</i>	17
<i>1.1.2</i>	<i>Epidemiologia e Impacto</i>	17
<i>1.1.3</i>	<i>Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) sobre a memória aversiva recente e tardia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ</i>	19
<i>1.1.4</i>	<i>Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) sobre a memória aversiva recente e tardia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ</i>	20
1.2	Etiologias e Patogênese	23
<i>1.2.1</i>	<i>Doenças de Alzheimer Esporádico e Familiar</i>	23
<i>1.2.2</i>	<i>Hipótese Genética</i>	24
<i>1.2.3</i>	<i>Hipótese da Cascata Amilóide</i>	25
<i>1.2.4</i>	<i>Hipótese Colinérgica</i>	26
<i>1.2.5</i>	<i>Hipótese Cerebrovascular</i>	27
<i>1.2.6</i>	<i>Hipótese de Glicodeprivação Cerebral</i>	28
<i>1.2.7</i>	<i>Outros Fatores Relacionados</i>	29
1.3	Tratamentos	30
1.4	Modelo Intracerebroventricular de Estreptozotocina	31
1.5	Cafeína	33
2	RELEVÂNCIA	36
3	OBJETIVOS	37

3.1	Objetivo Geral	37
3.2	Objetivos Específicos	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Animais	38
4.2	Drogas	38
4.3	Indução do Modelo pela Injeção de Estreptozotocina	38
4.4	Protocolo Experimental	39
4.5	Análise da Glicemia	40
4.6	Testes Comportamentais	41
4.6.1	<i>Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto</i>	41
4.6.2	<i>Avaliação da ansiedade - Labirinto em cruz elevado</i>	41
4.6.3	<i>Avaliação da memória de trabalho - Teste Labirinto em Y (Y-maze)</i>	42
4.6.4	<i>Avaliação da memória de reconhecimento- Teste do Reconhecimento de Objetos</i>	43
4.6.5	<i>Avaliação da Memória Aversiva- Teste da Esquiva Passiva</i>	44
5	RESULTADOS	45
5.1	A injeção intrecerebrocetricular de STZ não induz alterações nos níveis de glicose periférica	45
5.2	A injeção intrecerebrocetricular de STZ e tratamento com cafeína não induz alterações na atividade locomotora no teste do campo aberto	46
5.3	A injeção intrecerebrocetricular de STZ e tratamento com cafeína não induz alterações na memória de trabalho no teste do labirinto em Y	48

5.4	A cafeína protege animais do déficit de memória de reconhecimento induzido pela injeção intrecerebrocetricular de STZ no teste do reconhecimento de objetos	48
5.5	A cafeína protege animais do déficit de memória aversiva induzido pela injeção intrecerebrocetricular de STZ no teste da esquiva passiva	50
5.6	A injeção intrecerebrocetricular de STZ e tratamento com cafeína não induz comportamento do tipo ansioso no teste do labirinto em cruz elevado	51
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Alzheimer

Em 1910 foi descrita, por Emil Kraepelin, a Doença de Alzheimer (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; HIPPIUS & NEUNDÖRFER, 2022). A doença recebeu o seu nome em homenagem à Alois Alzheimer, que em 3 de Novembro de 1906 apresentou-a na 37ª reunião da Sociedade de Psiquiatras Alemães do Sudeste, em Tübingen, os resultados de suas análises morfológicas (Imagem 1) e histopatológicas da autópsia cerebral do caso de Auguste D., senhora de 50 anos institucionalizada no Hospital Psiquiátrico de Comunidade de Frankfurt am Main (FERRI *et al.*, 2005; GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; HIPPIUS & NEUNDÖRFER, 2022). Recebendo pouca atenção inicialmente, as descobertas de Alzheimer somente foram amplamente reconhecidas após sua inclusão no famoso livro *Psychiatrie*, de Kraepelin, publicado em 1910, introduzindo o termo diagnóstico de Doença de Alzheimer (DA) (HIPPIUS & NEUNDÖRFER, 2022).

Imagem 1: Representação morfológica de um hemisfério de um cérebro saudável (esquerda) e um hemisfério de um cérebro com DA (direita).



Fonte: National Institute on Aging, <https://www.nia.nih.gov/>, editado.

1.1.1. Definição da Doença:

O termo “Doença de Alzheimer”, como definido pela Associação de Alzheimer do Instituto Nacional do Envelhecimento dos EUA (NIA-AA), se refere a uma síndrome de distúrbios neuropatológicos, que não deve ser definido por sintomas clínicos, e sim por biomarcadores, em pacientes vivos, ou por exame pós-morte (JACK JR *et al.*, 2018). Isso é devido à baixa confiabilidade de diagnósticos clínicos baseados no fenótipo de demência amnésica multidomínio que foi historicamente utilizado, e o termo “Síndrome Clínica de Alzheimer” é recomendado para diagnósticos baseados em tal (JACK JR *et al.*, 2018). Anormalidades de biomarcadores de deposição do peptídeo Beta Amilóide (A β) são os primeiros a serem encontrados durante a patogênese de DA, e, juntamente com biomarcadores que indicam a presença de depósitos de filamentos pareados helicoidais de Tau, são necessários para satisfazer os critérios neuropatológicos de DA, e, portanto, devem ocorrer para o diagnóstico de Doença de Alzheimer’s. Caso os biomarcadores evidenciam somente a presença de deposição de A β , o termo “Alteração Patológica de Alzheimer” é indicado (JACK JR *et al.*, 2018).

1.1.2. Epidemiologia e Impacto:

DA é a causa mais comum de demência, constituindo aproximadamente 75% de seus casos, afetando 3,9% da população mundial com acima de 60 anos e sendo responsável por 11,2% dos anos vivenciados com desabilidade por esta mesma faixa etária (FÖRSTL & KURZ, 1999; FERRI *et al.*, 2005; WIRTZ *et al.*, 2014; QIU *et al.*, 2022). A doença é mais prevalente na América do Norte, e o risco de desenvolvê-la aumenta quase exponencialmente após 85 anos de idade, iniciando com por volta de 2,0% de prevalência nas idades de 65 a 69 anos e elevando-se a quase 40% nas idades de 90 a 94 anos (CASTRO *et al.*, 2010; WIRTZ *et al.*, 2014; QIU *et al.*, 2022). Esse problema é exacerbado pela tendência mundial de envelhecimento da população, devido ao aumento da expectativa de vida, e o decréscimo da natalidade em muitos países, especialmente países desenvolvidos (FRANCIS *et al.*, 1999; CASTRO *et al.*, 2010; QIU *et al.*, 2022); fatores que em conjunto justificam as estimativas de que o número de idosos (pessoas com acima de 65 anos) irá aumentar de 420 milhões, em 2000, a 1 bilhão em 2030, elevando a proporção desta faixa etária em relação às outras de 7%

a 12% (QIU *et al.*, 2022), e a 16,2% em 2050 (CASTRO *et al.*, 2010). Acredita-se que a expectativa de vida média mundial continuará a aumentar, crescendo de 72,8 anos em 2019 a 77,2 anos em 2050; enquanto a fertilidade média mundial diminuirá de 2,3 nascimentos por mulher para 2,1 em 2050; conjuntamente exacerbando esta tendência de envelhecimento relativo da população mundial (UNITED NATIONS, 2022). É estimado que o número mundial de pacientes de DA duplicará em 2040 em relação à 2020 (FERRI *et al.*, 2005).

Os impactos de DA no indivíduo são severos, significativamente reduzindo a expectativa de vida de pacientes e constituindo um dos principais motivos de deficiências físicas, institucionalizações e qualidade de vida impactada em idosos (QIU *et al.*, 2022). Aproximadamente 43% de pacientes de DA necessitam de cuidados intensivos, e os custos mundiais estimados devido à demências em geral foi estimada como sendo de 315 bilhões de dólares em 2005 (CASTRO *et al.*, 2010; QIU *et al.*, 2022), sendo a terceira doença mais custosa após somente câncer e doença cardíaca coronária nos EUA (CASTRO *et al.*, 2010). A expectativa de vida de pacientes de DA após seu diagnóstico era de somente 5 a 8 anos (FÖRSTL & KURZ, 1999), sendo mais recentemente de em média 9 anos para pacientes diagnosticados aos 65 anos (CASTRO *et al.*, 2010), e o cuidado requerido por pacientes de demências impõe consideráveis fardos psicológicos, práticos e econômicos nos familiares (FERRI *et al.*, 2005). Nos estágios leves e moderados da DA, os principais custos são geralmente indiretos, devido ao cuidado pessoal que a doença demanda de familiares, que varia em torno de 11 a 70 horas por semana, e que em metade dos casos constitui de mais que uma pessoa (CASTRO *et al.*, 2010). Os danos à saúde física e mental dos cuidadores também é considerável, com até 30% destes sofrendo de depressão, além de maiores níveis de estresse e ansiedade (CASTRO *et al.*, 2010). Esses custos, porém, podem ser convertidos em custos diretos ao contratar cuidadores ou institucionalizar o paciente, cuja ocorrência é proporcional à severidade da DA, sendo este um dos motivos pelos quais 50% a 75% dos custos diretos provenientes de DA ocorrerem nos seus estágios avançados, sendo elevados ao ponto de poder consumir 66% a 75% da renda familiar (CASTRO *et al.*, 2010).

Medicamentos impõem um custo direto considerável à família do paciente, porém podem reduzir os custos indiretos ou mesmo diretos, bem como melhorar a qualidade de vida do paciente em si (CASTRO *et al.*, 2010). Considerando que estes medicamentos tendem a ser mais custo-efetivos durante os estágios mais leves da doença, e que o adiamento da progressão da doença naturalmente resulta em manter os custos mais baixos associados à menor severidade, a utilização de drogas para o tratamento do paciente constitui em um grande benefício econômico para a sua família ao eliminar, reduzir, ou adiar a necessidade

de gastos diretos ou indiretos com medidas como cuidado intensivo ou institucionalização do paciente (CASTRO *et al.*, 2010). Adicionalmente, distúrbios neuropsiquiátricos relacionados à doença, como alucinações e apatia, são grandes contribuintes aos custos elevados de DA (CASTRO *et al.*, 2010), sugerindo que o alívio de tais sintomas a partir de medicamentos pode ser efetivo para aliviar o impacto econômico da doença.

1.1.3. Progressão e Sintomas Clínicos:

Em relação à sua progressão, a DA é caracterizada por um declínio crônico e progressivo de habilidades cognitivas e neurocomportamentais, em principal em relação à memória, sendo primeiro detectado após um longo período assintomático, que acredita ser de 20 a 30 anos (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; WIRTZ *et al.*, 2013). A fase inicial clínica é comumente denominada Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico (CCLA) (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; WIRTZ *et al.*, 2013), e alterações comportamentais não cognitivas, como isolamento social e disforia depressiva, podem ocorrer anos antes do diagnóstico da doença (FÖRSTL & KURZ, 1999; JACK JR *et al.*, 2018).

Durante os primeiros estágios de DA, os principais sintomas clínicos na maioria dos pacientes são déficits significativos na capacidade de aprendizado e memória, porém distúrbios afásicos ou visual-construcionais podem ser maiores em alguns indivíduos (FÖRSTL & KURZ, 1999). Memória de curto-prazo, memória implícita e memória declarativa antiga são significativamente menos afetados do que memória declarativa recente, que constitui o maior obstáculo para o seu funcionamento normal no dia-a-dia (FÖRSTL & KURZ, 1999). Sintomas depressivos ou outras alterações neurocomportamentais podem ser prevalentes nos estágios iniciais, sendo em alguns casos a queixa principal (FÖRSTL & KURZ, 1999; JACK JR *et al.*, 2018).

Com o progresso da doença, os distúrbios da memória, dificuldades linguísticas e deficiências cognitivas se tornam mais severas, e ações do dia a dia que são sequências ideomotoras de ações se tornam progressivamente mais desorganizadas, até o indivíduo não conseguir mais realizá-las (FÖRSTL & KURZ, 1999; JACK JR *et al.*, 2018). A sua desorientação espacial se torna mais agravada, e agnosia visual cortical, alucinações visuais se tornam presentes. Anosognosia e forte inquietação se tornam presentes, e há a perda de controle emocional, que pode vir em conjunto com maior agressividade física ou verbal (FÖRSTL & KURZ, 1999).

Nos estágios mais graves da doença, as perdas cognitivas são tão severas e abrangentes que é difícil distingui-las, e pode ocorrer mesmo perda de memórias autobiográficas antigas (FÖRSTL & KURZ, 1999). A capacidade comunicativa é quase completamente perdida, e indivíduos se tornam limitados a frases simples ou mesmo somente palavras (FÖRSTL & KURZ, 1999). A maioria dos pacientes ainda possuem receptividade emocional, e sinais de apatia e exaustão são comuns, enquanto inquietação e agressividade podem ser causadas por dor ou pelas consequências de um ciclo circadiano conturbado (FÖRSTL & KURZ, 1999). Os pacientes podem precisar de ajuda para efetuar mesmo as funções motoras mais básicas, como mastigação, e incontinência dupla é comum (FÖRSTL & KURZ, 1999). Pneumonia seguida por infarto no miocárdio e septicemia são as principais causas de morte em pacientes com DA (FÖRSTL & KURZ, 1999).

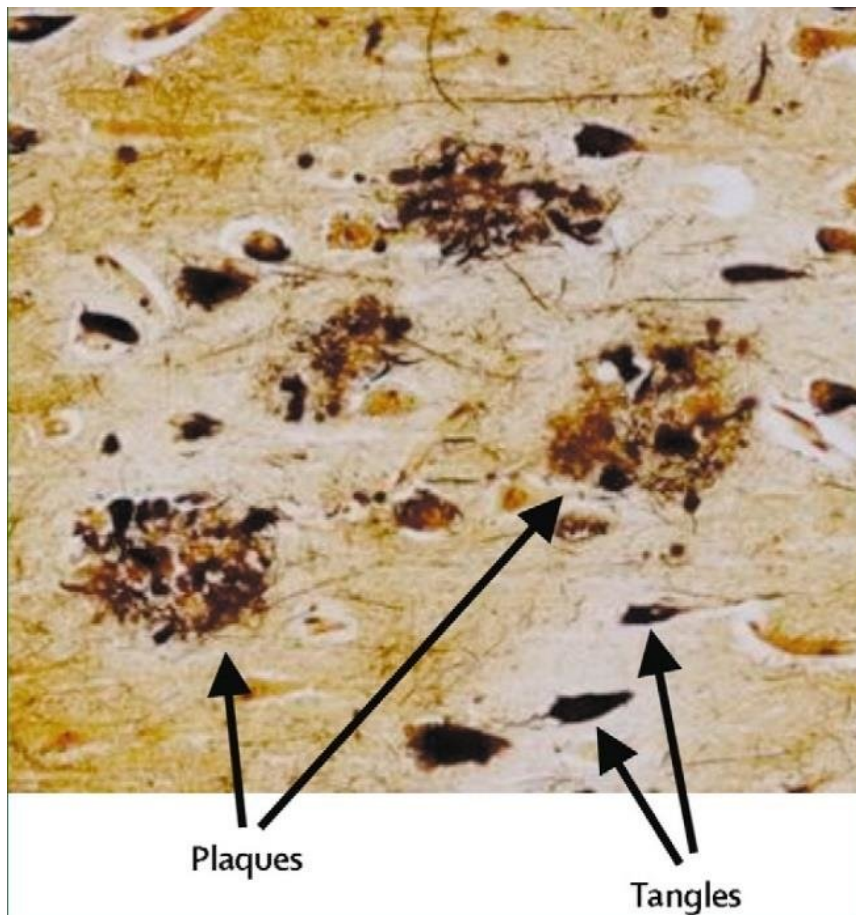
O estagiamento clínico numérico para pacientes no contínuo de Alzheimer's mais recente foi elaborado em JACK JR *et al.*, 2018, e divide o progresso da doença em seis estágios, onde nenhum declínio cognitivo é observado no estágio 1; um declínio cognitivo transicional e alterações neurocomportamentais são observados no estágio 2; evidências de declínios cognitivos mais claros são encontrados no estágio 3, e, nos estágios 4 a 6, ocorre demência progressivamente severa com fortes impactos no dia a dia que causam necessidade de assistência continuamente maior (JACK JR *et al.*, 2018).

1.1.4. Fisiopatologia:

A DA é caracterizada por uma perda progressiva de neurônios e sinapses, bem como pela presença de emaranhados neurofibrilares (ENF), placas neuríticas (ou placas senis) (PN), neuritos distróficos e fios neuropilares (Imagem 2) (FRANCIS *et al.*, 1999; STEEN *et al.*, 2005; GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; WIRTZ *et al.*, 2013; JACK JR *et al.*, 2018). Os ENFs e PNs aparentam formar-se independentemente, com os ENFs formando primeiramente, na região transentorrinal e posteriormente no hipocampo, amígdala, e então as áreas neocorticais (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; WIRTZ *et al.*, 2013); enquanto a formação de PNs começa no neocórtex e aparenta exacerbar a formação de ENFs (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; WIRTZ *et al.*, 2013). Os PNs são acumulações extracelulares constituídas de estruturas amilóides, que são filamentos protéicos de aproximadamente 10 nm de diâmetro com uma estrutura cross- β , e ENFs possuem estrutura de hélice pareada, e ocorrem nos corpos celulares de nervos, em neuritos de neurópilos e na periferia de PNs. (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; JACK JR *et al.*, 2018). O principal

constituente dos PNs é a amilóide- β , e a proteína tau hiperfosforilada de comprimento completo é o principal componente de ENFs (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; JACK JR *et al.*, 2018).

Imagem 2: Placas Neuríticas e Emaranhados Neurofibrilares em corte histológico de cérebro com Doença de Alzheimer



Fonte: SCHRAMM, 2018.

Amilóide- β ($A\beta$) constitui um grupo de peptídeos que possuem de 37 a 49 aminoácidos, sendo os de 40 e 42 resíduos os principais, e, dentre eles, a forma de 42 resíduos a mais amiloidogênica (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; CHEN *et al.*, 2017). $A\beta$ provém da clivagem proteolítica da proteína precursora de amilóide (APP), mapeado ao cromossomo 21 (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; CHEN *et al.*, 2017). $A\beta$ solúvel é altamente neurotóxico, e precede a formação de PNs (WIRTZ *et al.*, 2013; GODYN *et al.*, 2016). Estresse oxidativo e formação de radicais livres elevados precedem a formação de PNs, porém o dano oxidativo é maior durante as primeiras fases de DA e diminui durante a

sua progressão, sugerindo que a doença é associada com alterações compensatórias, como aumento de isoprostanos, que são correlacionados aos níveis de A β e Tau no Fluido Cérebro Espinhal, e outros fatores (WIRTZ *et al.*, 2013). Outros estudos, porém, não indicam níveis de estresse oxidativos maiores em fases iniciais de DA, e sugerem que A β indiretamente aumenta a produção de radicais livres ao causar danos à mitocôndria e diretamente ao alterar a atividade oxidorredutora de vários metais, cujos distúrbios são também associados à doença (WIRTZ *et al.*, 2013).

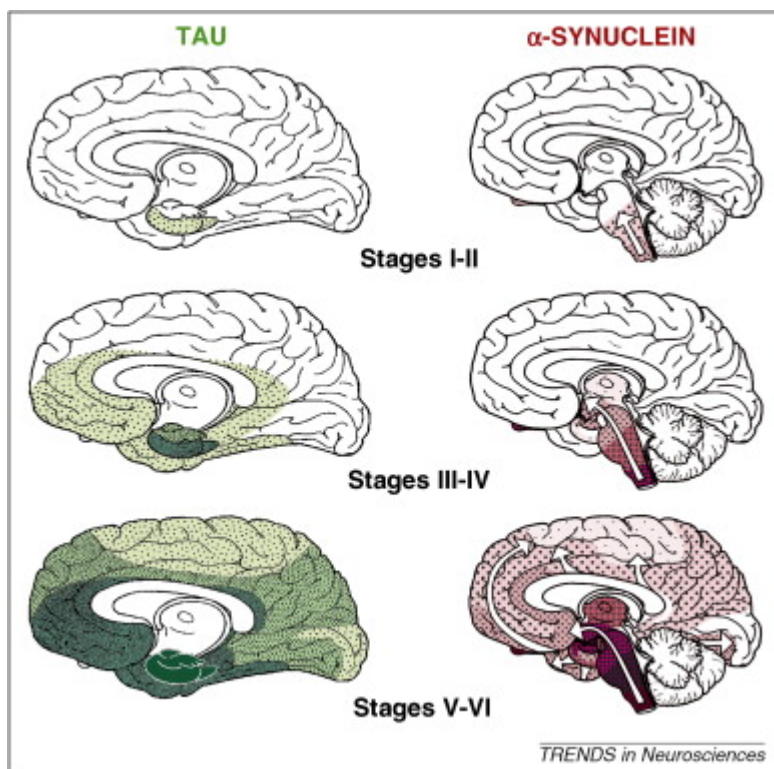
A proteína Tau possui seis isoformas participa da formação e estabilização de microtúbulos, e suas isoformas são produzidas a partir do mesmo gene por splicing alternativo de mRNA e são igualmente divididas em dois grupos baseado na presença de três ou quatro repetições ligantes a microtúbulos (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006). Existem várias doenças com presença de tau hiperfosforilada, e mutações no gene de tau causam demência frontotemporal herdável e parkinsonismo ligado ao cromossomo 17 (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006). A distribuição regional de ENFs possui melhor correlação com a severidade de DA do que os acúmulos de A β (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006).

Outras características da DA incluem perda celular, neuroinflamação e ativação elevada de vias e genes apoptóticos, distúrbios no metabolismo energético, atividade colinérgica reduzida, e estresse oxidativo crônico (STEEN *et al.*, 2005; SAPPANIN *et al.*, 2008; WIRTZ *et al.*, 2013). Hipometabolismo de glicose e distúrbios na sinalização de insulina são características de cérebros com DA, sendo o primeiro um dos sinais mais iniciais da doença, podendo ser detectado até três décadas antes do aparecimento de sintomas clínicos de DA familiar (WIRTZ *et al.*, 2013; GRIEB, 2016). Significativamente, o decréscimo do consumo de glicose no cérebro com DA é muito maior do que a redução de consumo de oxigênio, um padrão de desproporcionalidade encontrado em todas as áreas do cérebro (GRIEB, 2016). Existem também crescentes evidências que α -Sinucleína participa da patofisiologia da doença, sendo presente na maioria dos cérebros afetados pela doença (imagem 3) (TWOHIG & NIELSEN, 2019).

Uma forma de classificação do progresso da doença no tecido cerebral pós-morte é baseado nos estágios de Braak (Imagem 3), que constitui de seis estágios, com um estágio adicional “0” usado para a ausência de alterações neurofibrilares (WIRTZ *et al.*, 2013). Nos estágios I e II, não é possível identificar declínio cognitivo clinicamente, constituindo portanto a fase pré-clínica da doença, porém já há presença de Tau hiperfosforilado no córtex transentorrinal (WIRTZ *et al.*, 2013). Nos estágios III e IV, alterações neurofibrilares mais elevadas são encontradas no córtex transentorrinal, porém também no hipocampo e área

límbica, com um início também identificável no córtex prefrontal. Nestes estágios, os pacientes possuem Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico, prodromal à DA (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; WIRTZ *et al.*, 2013). Finalmente, nos estágios V e VI, a maioria do neocórtex é severamente afetado pelas alterações neurofibrilares, e é normalmente onde o diagnóstico de demência ocorre (WIRTZ *et al.*, 2013).

Imagem 3: Localização de inclusões de Tau e Alfa-Sinucleína nos estágios de Braak



Fonte: Cell Press, www.cell.com

1.2. Etiologias e Patogênese

1.2.1. Doenças de Alzheimer Esporádico e Familiar

As DA é uma doença multifacetada e com múltiplas possíveis etiologias (QIU *et al.*, 2022). Ela é fortemente associada com a idade, que constitui o seu principal fator de risco (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; QIU *et al.*, 2022), e hipóteses etiológicas como causas genéticas, vasculares e psicossociais são as melhor evidenciadas epidemiologicamente,

porém fatores nutricionais e inflamatórios, dentre outros, também constituem hipóteses para causas da doença (QIU *et al.*, 2022).

A DA pode ser dividida entre DA Esporádico (DAE) e DA Familiar (DAF), distinguidos entre-si pela sua etiologia, onde DA Familiar é associado a certas mutações genéticas e, portanto, hereditária; enquanto DA Esporádico é proveniente de causas ambientais e também causas genéticas (PIACERI *et al.*, 2013). Noventa por cento dos casos de DA são esporádicos, com essa forma predominantemente diagnosticada em indivíduos com acima de 65 anos (DUARA *et al.*, 1993; WIRTZ *et al.*, 2013). A clinicopatologia dos tipos de DA são diferentes, com sinais e sintomas atípicos mais frequentes em DA familiar do que esporádico (DUARA *et al.*, 1993; SHINOHARA *et al.*, 2014). Características fisiopatológicas também diferem: DA esporádico (DAE) apresenta acumulação desproporcionada de A β em áreas corticais quando comparada à DA familiar (DAF), que por sua vez possui maior acumulação em áreas subcorticais e maior patologia estriatal de Tau (SHINOHARA *et al.*, 2014).

1.2.2. Hipótese Genética

A hipótese genética é a qual possui maior evidências, e é a principal etiologia de DAFs, que em conjunto compõem aproximadamente 10% dos casos de DA; porém, estimativas variam na bibliografia (DUARA *et al.*, 1993; PIACERI *et al.*, 2013; GRIEB, 2016; QIU *et al.*, 2022). Existem formas de DA familiar de início tardio e início cedo, mapeados a mutações em genes diferentes (DUARA *et al.*, 1993; GOEDERT & SPILLANTINI, 2006), e, em conjunto, a herdabilidade da doença aparenta ser maior por parte da mãe do que por parte do pai (DUARA *et al.*, 1993). Mutações do gene de APP aumentam a produção de A β ou a proporção de A β com 42 aminoácidos, e mutações na região específica codificante de A β podem não influenciar o processamento de APP, porém somente a facilidade de A β coalescer e formar fibrilas (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; PIACERI *et al.*, 2013; SHINOHARA *et al.*, 2014). Duplicações do gene de APP causa deposição de A β na neurópila e vasos sanguíneos (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006). Mutações no gene de APP, porém, causam somente uma minoria de casos famílias de DA, sendo mutações no gene de presenilina-1, no cromossomo 14, a causa mais comum, e mutações no gene de presenilina-2 também resultam em DP (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; PIACERI *et al.*, 2013; SHINOHARA *et al.*, 2014). O gene presenilina-1 codifica presenilinas, que são proteínas transmembranas que servem como componentes centrais de

complexos de proteases aspartil atípicas, responsáveis pela clivagem por γ -secretase de APP; de tal forma, mutações no seu gene que resultam em redução de sua atividade fazem com que a clivagem resulte em mais A β 42 em relação a A β 40 (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006).

Um dos principais riscos genéticos para o desenvolvimento de DA é proveniente do alelo ϵ 4 da Apolipoproteína E (APOE), expressada em principal no fígado e em células gliais do cérebro, e que funciona como um ligando na endocitose de partículas de lipoproteínas mediada por receptores (KIM *et al.*, 2009). A APOE possui forte associação com A β no cérebro e os diferentes isomorfismos de APOE são associados com uma aceleração da deposição de A β em PNs (KIM *et al.*, 2009). Existem também evidências que APOE influencia o transporte e metabolismo de A β no cérebro, facilitando a ligação e internalização de A β solúvel por células neuronais e facilitando a degradação celular do peptídeo, existindo também indícios mais controversos de também possuir efeitos sobre o processamento de APP (KIM *et al.*, 2009). Finalmente, APOE também aparenta possuir função anti-inflamatória e A β resulta no aumento de seus níveis, possivelmente servindo como um mecanismo de feedback à neuroinflamação causada pelo peptídeo, enquanto pelo menos duas de suas isoformas possuem capacidade anti-inflamatória reduzida ou mesmo capacidade pró-inflamatória, o que em conjunto com o anteriormente exposto podem constituir os mecanismos que causam estas isoformas disfuncionais de APOE elevarem o risco de desenvolvimento de DA (KIM *et al.*, 2009).

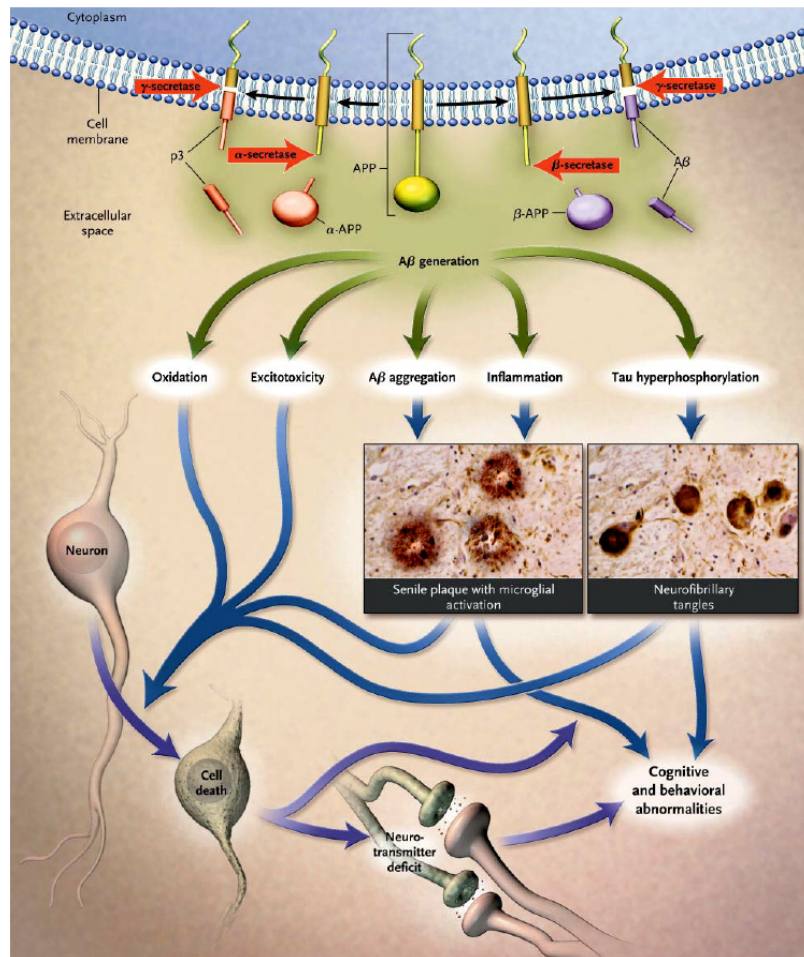
DAEs, porém, não são somente resultantes de tais mutações, e suas possíveis etiologias ainda não são bem estabelecidas. Uma hipótese relacionada, porém, sugere que danos ao DNA também participam no desenvolvimento da doença (WIRTZ *et al.*, 2013), podendo isto constituir um importante aspecto genético relacionado aos DAs em geral. Indícios de sua participação no desenvolvimento de DAs já existem, onde camundongos transgênicos com APP demonstram maior quantidade de quebras de fita-dupla de DNA e redução de reparo de DNA em comparação a camundongos tipo-selvagem, e A β é capaz de induzir danos ao DNA em culturas neuronais (WIRTZ *et al.*, 2013).

1.2.3. Hipótese da Cascata Amilóide

A hipótese da cascata amilóide (Imagem 4), proposta por George Glenner em GLENNER & WONG, 1984, postula que a deposição intracerebral de A β , juntamente com lesões cerebrais como emaranhados neurofibrilares, neuritos distróficos, dentre outros, são responsáveis pela patologia de DA (FRANCIS *et al.*, 1999; GRIEB, 2016; SELKOE &

HARDY, 2016). Modificações na sua conceptualização foram feitas com o passar do tempo, como a reconição de que formas intracelulares fibrilares oligoméricas de A β possuem neurotoxicidade, diferentemente das placas amilóides extracelulares (GRIEB, 2016), porém evidências provenientes estudos clínicos e pré clínicos suportam essa hipótese cada vez mais (SELKOE & HARDY, 2016). A β solúvel apresenta neurotoxicidade ainda maior que fibrilas, e precede a formação de placas amilóides (WIRTZ *et al.*, 2013; GODYN *et al.*, 2016). Todas as mutações genéticas que resultam em DA de início precoce aparentam possuir efeitos sobre o metabolismo de A β (WIRTZ *et al.*, 2013; SELKOE & HARDY, 2016), e os níveis de proteínas envolvidas no metabolismo de A β são significativamente alteradas em ambos DA esporádico e familiar (SHINOHARA *et al.*, 2014).

Imagem 4: Representação da hipótese amilóide.



Fonte: GHAREEB *et al.*, 2013 *apud* CUMMINGS, 2004.

1.2.4. Hipótese Colinérgica

A hipótese colinérgica explica a degeneração de neurônios colinérgicos associados à DA são os principais contribuintes para o declínio cognitivo experienciado por pacientes com a doença (FRANCIS *et al.*, 1999). O início de distúrbios seletivos de neurotransmissores inicia-se no começo da doença, com redução significativa de marcadores pré-sinápticos do sistema colinérgico e correlacionada ao nível de declínio cognitivo encontrado nos pacientes, tais como a redução da atividade de Colina Acetiltransferase, a enzima responsável pela síntese de Acetilcolina, e as consequentes reduções nos níveis destes últimos, indicando que a inervação colinérgica neocortical é perdida nas primeiras fases da doença (FRANCIS *et al.*, 1999). Marcadores serotoninérgicos e noradrenérgicos também são afetados pela DA, porém dopamina, GABA e somatostatina se mantêm praticamente inalterados nas fases iniciais da doença, se tornando afetados em maior grau em estágios posteriores (FRANCIS *et al.*, 1999). Outro fator correlacionado ao declínio cognitivo são os marcadores químicos e histopatológicos de neurônios piramidais corticais, que participam da função colinérgica, e cuja hipofunção resulta em um desbalanço da neurotransmissão na doença (FRANCIS *et al.*, 1999). APP é regulado pela acetilcolina, e inibidores de Acetilcolinesterase, a enzima que catalisa a degradação de Acetilcolina, são tratamentos efetivos contra sintomas cognitivos de DA ao aumentar seus níveis no Sistema Nervoso Central, evidenciando o impacto indireto, porém significativo, desse neurotransmissor em funções cognitivas ao interferir com o processamento atencional normal (FRANCIS *et al.*, 1999).

1.2.5. Hipótese Cerebrovascular

A hipótese cerebrovascular sugere que fatores como o decréscimo da densidade vascular, aumento da curvatura de vasos sanguíneos, degeneração das células de músculo liso nas suas paredes, alterações no endotélio, fragmentação de capilares, e distúrbios na permeabilidade da barreira hematoencefálica e lesões vasculares, que ocorrem em maior frequência em pacientes de DA e precedem declínios cognitivos e são exacerbados durante o progresso da doença, podem ser responsáveis pelo seu desenvolvimento (WIRTZ *et al.*, 2013; QIU *et al.*, 2022). Infartos cerebrais silenciosos, comuns em idosos saudáveis, aumentam em mais de duas vezes o risco de desenvolvimento de demências, e, em camundongos com sobre-expressão do gene APP humano são mais suscetíveis a infartos devido à ação da

microglia (WIRTZ *et al.*, 2013). A β acumula em células perivasculares, e em células de músculos lisos de capilares cerebrais, podendo também ocorrer a sua produção nestes locais, e nestes últimos são abundantemente expressos LRP1, o principal receptor de remoção de A β (WIRTZ *et al.*, 2013). Isquemia e hipóxia no córtex e hipocampo são responsáveis por aumento na expressão de A β e inibição da quebra de A β (WIRTZ *et al.*, 2013). Angiopatia Amilóide Cerebral é encontrado em pacientes de DA e modelos de camundongos, e resultam na degeneração do músculo liso vascular, redução da angiogênese e tônus vascular, resultando em uma redução da corrente sanguíneo ao cérebro, gerando hipoperfusão, hipóxia, isquemia cerebral e morte neuronal (WIRTZ *et al.*, 2013). Deposição de A β e isquemia hipóxica sinergisticamente deterioram a função cognitiva e levam à morte neuronal (WIRTZ *et al.*, 2013).

1.2.6. Hipótese de Glicodeprivação Cerebral

A hipótese de Glicodeprivação Cerebral, mais recente, postula que o declínio do metabolismo de glicose pelos tecidos cerebrais, cuja oxidação é a principal fonte de energia do cérebro, é o fator central relacionado à neurodegeneração associada à DA, que é classificada como um estado cerebral resistente à insulina, sendo a formação de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares posterior e resultante disto (STEEN *et al.*, 2005; GHAREEB *et al.*, 2013; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; WIRTZ *et al.*, 2013; GRIEB, 2016). O metabolismo energético e de glicose é alterado pelo processo natural de envelhecimento e é essencial para o funcionamento do cérebro (HOYER *et al.*, 1994), podendo parcialmente justificar o aumento de risco de DA esporádica com a idade. De fato, anormalidades no metabolismo energético são encontradas em pacientes com CCLA e no início de DA, como a decréscimo de enzimas mitocondriais envolvidas no metabolismo energético (WIRTZ *et al.*, 2013). O decréscimo de níveis de ATP pode levar à acumulação intracelular de íons de sódio, causando excitotoxicidade (WIRTZ *et al.*, 2013).

O nome de Diabetes Tipo 3 foi proposto e é hoje utilizado para descrever esta inabilidade dos tecidos cerebrais de responder apropriadamente à insulina e de manter o metabolismo de glicose adequado (STEEN *et al.*, 2005; GRIEB, 2016), sendo isso efetivamente a forma cerebral de Diabetes *Mellitus* não-insulino-dependente (Diabetes Tipo 2) (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013). A própria Diabetes Tipo 2 é comumente acompanhada por Comprometimento Cognitivo Leve Amnésico (WIRTZ *et al.*, 2013). Em suporte a essa hipótese há o fato que peptídeos e receptores de insulina, IGF-1 e IGF-2 são

expressos no cérebro, porém a expressão de seus mRNAs é fortemente reduzido em cérebros com DA (STEEN *et al.*, 2005; WIRTZ *et al.*, 2013), e sua utilização de glicose foi observada sendo reduzida de 19% a 40%, dependendo da topografia e severidade da doença (HOYER *et al.*, 1994; WIRTZ *et al.*, 2013), juntamente com o aumento de insulina no plasma e redução na insulina no Fluido Cerebrospinal (FCS) (WIRTZ *et al.*, 2013). Mesmo fases prodromais possuem redução na sinalização de insulina (WIRTZ *et al.*, 2013). Hiperglicemia aumenta a geração de radicais livres, resultando em maior estresse oxidativo, ao qual o cérebro é extremamente vulnerável devido à sua baixa capacidade antioxidante (SAPCANIN *et al.*, 2008; WIRTZ *et al.*, 2013; GRIEB, 2016), e hiperinsulinemia reduz transporte de insulina para o cérebro, reduzindo a sinalização de insulina no cérebro (WIRTZ *et al.*, 2013). Vários estudos longitudinais indicam que pessoas com diabetes ou reduções no metabolismo energético no cérebro são mais suscetíveis a desenvolver demências neurodegenerativas, e mesmo pré-diabetes ou distúrbios na tolerância de glicose também estão relacionados a um maior risco (WIRTZ *et al.*, 2013 QIU *et al.*, 2022).

Sinalização de insulina e IGF-1 são responsáveis por regular a expressão e fosforilação da proteína Tau, e o decréscimo de suas funções resultam na hiperfosforilação de Tau e as suas patologias decorrentes (GHAREEB *et al.*, 2013; WIRTZ *et al.*, 2013). Declínios no metabolismo de glicose também são positivamente correlacionados à hiperfosforilação de Tau e a formação de ENFs (WIRTZ *et al.*, 2013). Insulina e IGF-1 também estimulam a liberação de A β intracelular, promovem a sua remoção, e protegem neurônios de sua citotoxicidade; sendo, de tal maneira, importantes para a homeostase da proteína (GHAREEB *et al.*, 2013; WIRTZ *et al.*, 2013). Devido à redução da expressão e interferência na autofosforilação do receptor insulina pela A β , o acúmulo de A β resulta em um *feedback loop* positivo patológico (WIRTZ *et al.*, 2013).

1.2.7. Outros Fatores Relacionados

Outras disfunções associadas ao início da doença incluem distúrbios na função mitocondrial, no metabolismo de colesterol e fosfolípidios, e da homeostase de cálcio (WIRTZ *et al.*, 2013). Como todos esses processos possuem o envolvimento das Membranas Associadas à Mitocôndrias (MAM), é suspeitado que ela está relacionada ao desenvolvimento de DA (WIRTZ *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudos indicam que a produção de A β ocorre no MAM, e que a sua atividade é significativamente elevada em fibroblastos de pacientes com DA esporádico ou familiar, sugerindo que a sua hiperatividade

é responsável pela produção elevada de A β em DA (WIRTZ *et al.*, 2013). Redução no número ou função sináptica no hipocampo e neocórtex é o principal fator estrutural correlacionado ao declínio cognitivo na DA, e possui relação com os estágios da classificação de Braak e da quantidade de ENFs em geral (WIRTZ *et al.*, 2013). O aumento de A β solúvel também aparenta estar relacionado ao desenvolvimento de disfunções sinápticas, devido à ação altamente sinaptotóxica desses oligômeros quando ligados à membranas sinápticas, e superprodução de A β reduz plasticidade, potencialização de longo-termo, e contatos sinápticos no hipocampo (WIRTZ *et al.*, 2013). Existem evidências que estágios iniciais de DA estão associados à hiperexcitabilidade neuronal, podendo alterar circuitos inibitórios importantes para trabalhos de memória, e de fato indivíduos com DA mais comumente sofrem de convulsões epiléticas do que indivíduos saudáveis (WIRTZ *et al.*, 2013).

1.3. Tratamentos

O desenvolvimento de tratamentos capazes de modificar as propriedades da DA é extremamente difícil e lento, e a grande maioria dos testes clínicos de novas terapias contra DA resultam em fracasso, geralmente devido a efeitos colaterais perigosos ou poucas evidências de efetividade terapêutica. (GODYN *et al.*, 2016). A primeira droga para o tratamento de DA foi Tacrina, um inibidor de Acetilcolinesterase, que foi rapidamente retirada do mercado devido a sérios efeitos colaterais; porém existem hoje três outros inibidores de colinesterase disponíveis (rivastigmina, donepezil e galantamina), juntamente com memantina, um antagonista do receptor de N-metil-D-aspartato (GODYN *et al.*, 2016). Essas drogas são incapazes de curar a DA ou parar o seu progresso, porém aliviam a perda de função cognitiva (GODYN *et al.*, 2016).

Tentativas de desenvolver terapias efetivas contra o desenvolvimento de DA incluem formas de imunização contra A β por imunoterapia ativa, cujos efeitos positivos até agora demonstraram ser poucos, porém com riscos de efeitos adversos autoimunes perigosos; e por imunização passiva, alguns dos quais tiveram péssimos resultados, enquanto outros aparentam ser mais promissores (GODYN *et al.*, 2016). Drogas inibidoras de secretases relacionados a A β também foram desenvolvidas, com a maioria resultando em efeitos colaterais adversos significativos observados, porém existindo algumas exceções bastante promissoras (GODYN *et al.*, 2016). Terapias direcionadas contra a proteína Tau aparentam ser mais promissoras, demonstrando menores riscos em geral quando comparadas às focadas em A β (GODYN *et al.*, 2016). A maioria dos outros métodos terapêuticos sendo investigados

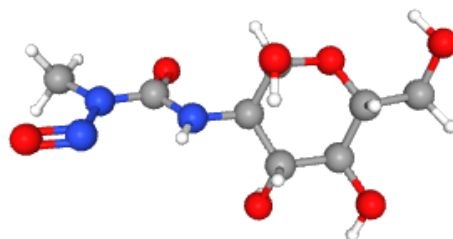
não possuem resultados publicamente disponíveis ou aparentam ser pouco efetivos (GODYN *et al.*, 2016).

Duas drogas recentemente desenvolvidas para o tratamento de DA, “Aducanumab” e “Lecanemab”, foram somente capazes de efetuar melhorias controversas e inconsistentes (KNOPMAN *et al.*, 2021; PRILLAMAN, 2022) ou moderadas (van DYCK *et al.*, 2022; PRILLAMAN, 2022), respectivamente, nos sintomas e desenvolvimento da doença, e a segurança de ambas é controversa, com indícios de que as duas drogas são capazes de causar efeitos colaterais potencialmente letais, como hemorragia cerebral (van DYCK *et al.*, 2022; PRILLAMAN, 2022).

1.4. Modelo Intracerebroventricular de Estreptozotocina

A Estreptozotocina (STZ) é um composto glucosamino-nitrosouréia alquilante antineoplástico proveniente da bactéria Gram-positiva *Streptomyces acromogenes* (DOLAN, 1997; GRIEB, 2016), de estrutura química similar à glicose (Imagem 5) (LELOUP *et al.*, 1994), que não atravessa a barreira hematoencefálica e possui efeito seletivamente tóxico para com as células produtoras e secretoras de insulina (SZKUDELSKI, 2001). A droga foi originalmente desenvolvida para o tratamento de cânceres, porém é atualmente usada como um dos mais importantes modelos de diabete insulina-dependente (SZKUDELSKI, 2001; GRIEB, 2016), e, quando administrado intracerebroventricularmente, STZ reduz a captação de insulina no cérebro ao dessensibilizar os receptores de insulina e IGFs, induzindo características moleculares, patológicas e comportamentais de DA (Imagem 6); sendo, por tal motivo, utilizado como modelo para a doença (HOYER *et al.*, 1994; SAPCANIN *et al.*, 2008; AGRAWAL *et al.*, 2011; GRIEB, 2016). A sua toxicidade é devido a sua ação alquilante sobre o DNA, causando necrose celular, e a sua captação celular ocorre através do transportador de glicose GLUT2, expressada principalmente por células Beta pancreáticas, e células dos rins e fígado (LELOUP *et al.*, 1994; SAPCANIN *et al.*, 2008; GRIEB, 2016). No cérebro, GLUT2 é maior expressada no hipotálamo e tronco cerebral, em neurônios, astrócitos, tanícitos e células epiteliais de ventrículos cerebrais (GRIEB, 2016).

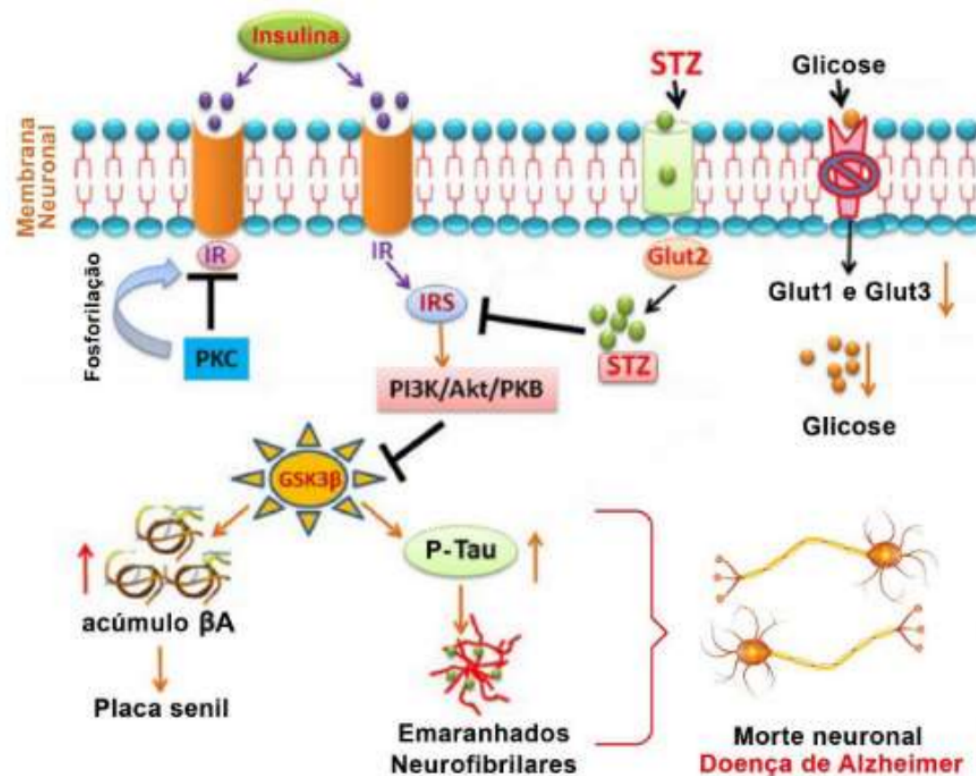
Imagem 5: Molécula de Estreptozotocina



Fonte: PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/streptozotocin>.

Por tais motivos, a administração de STZ afeta o metabolismo energético e de glicose (SAPCANIN *et al.*, 2008; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; GRIEB, 2016), função hipocampal colinérgica (BLOKLAND & JOLLES, 1994; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013), e neurogênese na zona subventricular e giro denteado (MISHRA *et al.*, 2018), causa aumento de expressão de proteínas associadas às patologias de A β e Tau, bem como elas próprias (SAPCANIN *et al.*, 2008; MISHRA *et al.*, 2018), aumento na neuroinflamação (MISHRA *et al.*, 2018), e redução da sinalização de insulina (AGRAWAL *et al.*, 2011; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; MISHRA *et al.*, 2018) e capacidade antioxidante do cérebro, causando estresse oxidativo (SAPCANIN *et al.*, 2008; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013). Várias alterações metabólicas similares à DA esporádica foram encontradas no modelo de STZ, como aumento da formação de lactato e acumulação de glicogênio, reduções na utilização de glicose, concentração de ATP, serotonina, noradrenalina e de creatina fosfato, além de redução de atividade enzimática na glicólise e da degradação de fosfolípidios de membrana (HOYER *et al.*, 1994).

Imagem 6: Mecanismo teórico de neurotoxicidade induzida por Estreptozotocina.



Fonte: RABELO, 2019 *apud* KAMAT *et al.*, 2015, editado

A administração intracerebroventricular (ICV) permite ultrapassar a barreira hematoencefálica, e, de tal forma, injetar altas concentrações de substâncias diretamente no cérebro (GRIEB, 2016) e ao mesmo tempo prevenindo substâncias incapazes de atravessar a barreira hematoencefálica, como STZ, de causar comprometimento sistêmico. ICV permite drogas betacitotóxicas como STZ causar efeitos deletérios no cérebro mesmo quando há a inibição do transporte de glicose (SAPCANIN *et al.*, 2008). Como consequência de tais efeitos, a administração intracerebroventricular de STZ em animais de laboratório resulta na deterioração crônica e progressiva de memória de longo- e curto-prazo, e é uma ferramenta importante para o entendimento da DA pela hipótese de glicodeprivação cerebral (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; GRIEB, 2016).

1.5. Cafeína

A ingestão de bebidas ricas em cafeína para manter-se acordado e alerta é uma prática milenar e que continua a se proliferar mundialmente (CAPPELLETTI *et al.*, 2015). O café, a bebida mais popular atrás somente da água, é proveniente da planta *Coffea arabica*, e

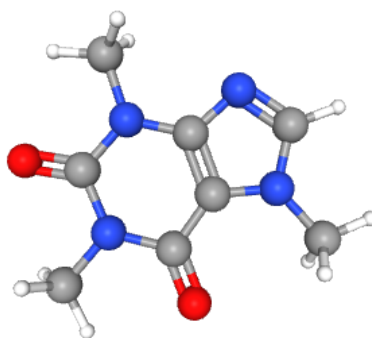
diariamente 1,6 bilhões de xícaras de café são consumidas em torno do mundo, em grande parte devido aos seus efeitos estimulantes (CAPPELLETTI *et al.*, 2015).

Cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide metilxantina (Imagem 7) proveniente de partes de plantas nativas da América do Sul e Leste da Ásia, enquanto a planta da qual o próprio café é feito é proveniente da Etiópia (COSTA *et al.*, 2008; CAPPELLETTI *et al.*, 2015; NCBI, 2022) e é o psicoestimulante mais consumido no mundo, ingerido primariamente a partir de bebidas e alimentos como café, chá, chocolate e refrigerantes (COSTA *et al.*, 2008; ARENDASH & CAO, 2010). A cafeína é estruturalmente relacionada à adenosina, funcionando como um antagonista competitivo de seus receptores, principalmente A1 e A2A, que possuem função *down*-reguladora de neurotransmissores como dopamina e glutamato, sendo este o mecanismo da ação inibidora na atividade do Sistema Nervoso Central por parte dos receptores de adenosina; a interação antagonista da cafeína com tais receptores, porém, reduzem a sua função inibidora, fazendo com que a droga produza seu efeito estimulante (COSTA *et al.*, 2008; CAPPELLETTI *et al.*, 2015; NCBI, 2022). A cafeína também possui efeitos psicotrópicos e anti-inflamatórios, sendo este último devido à inibição competitiva não-seletiva de fosfodiesterases, cuja inibição aumenta a concentração intracelular de Adenosina Monofosfato Cíclica (cAMP), ativa a cinase A, e inibe síntese de leucotrieno, que conjuntamente reduzem o processo inflamatório (CAPPELLETTI *et al.*, 2015; NCBI, 2022).

Existem uma grande variedade de indícios e evidências que sugerem que a cafeína é capaz de servir como um tratamento efetivo para diferentes doenças, incluindo DA (MAIA & DE MENDONÇA, 2002; COSTA *et al.*, 2008; ARENDASH & CAO, 2010; GELBER *et al.*, 2011; CAPPELLETTI *et al.*, 2015). Vários estudos demonstram que o consumo de cafeína é associado a melhor execução cognitiva, redução de declínios cognitivos associados à idade, incluindo uma associação epidemiológica significativa entre o decréscimo no consumo de cafeína durante os 20 anos antes do diagnóstico e o próprio diagnóstico de DA (MAIA & DE MENDONÇA, 2002; COSTA *et al.*, 2008; ARENDASH & CAO, 2010; GELBER *et al.*, 2011), e reduzem o risco de formação de lesões cerebrais correlacionados à demência (GELBER *et al.*, 2011), porém existem inconsistências entre os resultados de estudos epidemiológicos realizados sobre o assunto, e indícios de que tais efeitos cognitivos positivos da cafeína são melhor associados ao alívio de sintomas de abstinência (GELBER *et al.*, 2011; CAPPELLETTI *et al.*, 2015). Evidências experimentais, porém, estão em suporte ao uso de cafeína e outros antagonistas do receptor de adenosina para o tratamento de diversos sintomas associados a doenças neurodegenerativas, incluindo morte neuronal

(CAPPELLETTI *et al.*, 2015). Os efeitos neuroprotetores de cafeína sobre DA é provavelmente devido à capacidade da substância de suprimir β - e γ -secretase, que são ambas as enzimas necessárias para a formação de A β no cérebro, e de fato sua administração crônica ou aguda reduz níveis de A β no plasma e no cérebro em modelos de camundongos transgênicos, bem como reversão da sua neuropatologia (ARENDASH & CAO, 2010) e prevenção da acumulação de A β dentro e em torno de vasos sanguíneos cerebrais (CAPPELLETTI *et al.*, 2015). Outros fatores que participam da sua atividade neuroprotetora são as atividades anti-inflamatórias e anti-oxidantes da cafeína, além de servir como ativador mitocondrial e estimulador de atividade neuronal e utilização de glicose, havendo estudos que sugerem que o consumo de cafeína diminui o risco de Diabetes Tipo 2 (ARENDASH & CAO, 2010). Adicionalmente, estes benefícios cognitivos da cafeína aparentam ocorrer diretamente, e não pelo seu principal metabólito ativo, teofilina, que não apresenta tais efeitos (ARENDASH & CAO, 2010). Isso sugere que tais efeitos positivos da cafeína são independentes à sua ação sobre receptores de adenosina, a qual é inferior ao de teofilina (ARENDASH & CAO, 2010).

Imagem 7 – Molécula de Cafeína



Fonte: PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>.

2. RELEVÂNCIA

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência e impõe enormes custos emocionais, financeiros, e na saúde e bem-estar do paciente, sua família, e seus cuidadores (CASTRO *et al.*, 2010; QIU *et al.*, 2022); custos que se tornam progressivamente severos com o desenvolvimento da doença, que atualmente não possui cura ou tratamento capaz de retardar o seu progresso (CASTRO *et al.*, 2010; QIU *et al.*, 2022). Por tais motivos, o estudo da doença de Alzheimer é contemporaneamente de grande importância, e sua relevância tende fortemente a se elevar com o passar do tempo, e o desenvolvimento de medicamentos e tratamentos baratos e eficientes é essencial para o suporte dos pacientes e seus familiares, bem como para o benefício da sociedade em geral. O desenvolvimento de novas drogas e terapias, porém, tendem majoritariamente a resultar em fracasso ou possuir efeitos colaterais severos (KNOPMAN *et al.*, 2021; PRILLAMAN, 2022; van DYCK *et al.*, 2022), e mesmo os tratamentos e cuidados já disponíveis e capazes de somente aliviar sintomas podem impor grandes custos financeiros diretos aos familiares (CASTRO *et al.*, 2010).

A cafeína, porém, é uma substância barata e de fácil acessibilidade, muito bem estudada em comparação com essas novas drogas, e cujos mecanismos de suas ações neuroprotetoras sobre a Doença de Alzheimer são similares a vários dos métodos terapêuticos que estão sendo clinicamente investigados (ARENDASH & CAO, 2010; GODYN *et al.*, 2016), demonstrando o potencial desta substância para ser usado como método terapêutico, que deve ser experimentalmente investigado de modo a encontrar resolução para os resultados conflitantes e controversos provenientes de estudos epidemiológicos observacionais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar o efeito neuroprotetor da cafeína frente às alterações cognitivas em camundongos submetidos ao modelo de Doença de Alzheimer Esporádica por Injeção Intracerebroventricular de estreptozotocina.

3.2. Objetivos Específicos:

Em animais com DAE e tratados com a cafeína, avaliar:

- Os efeitos sobre a atividade locomotora e ansiedade;
- Os efeitos sobre a memória (de trabalho, de reconhecimento e aversiva).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 40 camundongos Swiss "*specific pathogen free*" (SPF), machos, pesando entre 25 e 35 gramas, provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em gaiolas micro isoladas, com ciclo claro/escuro de 12/12 h e alimentados com ração peletizada padrão e água *ad libitum*. No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número de registro 8904290319.

4.2. Drogas

Estreptozotocina (SIGMA-USA), Cafeína (SIGMA-USA), Quetamina 90 mg/Kg (Vetanarcol®), Xilazina 10mg/Kg (Rompum®). Os reagentes usados foram de grau analítico.

4.3. Indução do Modelo pela Injeção de Estreptozotocina

O modelo de DA foi induzido pela administração intracerebroventricular de estreptozotocina. Os procedimentos de lesão foram realizados através de cirurgia estereotáxica. Os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/Kg via intraperitoneal, i.p.) e quetamina (90mg/Kg i.p.) e posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting®). Foi realizada uma incisão sagital mediana de aproximadamente 2 cm de comprimento com um bisturi, no alto do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o bregma. Os orifícios foram perfurados no crânio em ambos os lados sobre os ventrículos laterais usando as seguintes coordenadas: 0,5 mm posterior ao bregma, 1,1 mm lateral à sutura sagital e 2,8 mm abaixo à superfície do cérebro (PAXINOS & FRANKLIN, 2004) (Tabela 1). Esse modelo experimental de lesão foi proposto por HOYER (1998). Foram realizadas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação (Dremel), permitindo entrada da seringa Hamilton com Estreptozotocina (STZ) (3 mg/Kg) sendo injetada intracerebroventricular (icv) bi-lateralmente nos dias 1 e 3 do experimento, em

ambos ventrículos, em cada lado (SHARMA & GUPTA, 2001). As micro-injeções foram realizadas por administração de STZ ou solução de veículo- Fluido Cérebro Espinhal artificial (aCSF), lentamente, ao longo de um período de 1 minuto e a agulha permaneceu na posição durante mais 5 minutos para prevenir o refluxo ao longo da seringa. Após as injeções, os cortes feitos nos animais foram suturados com fio cirúrgico de nylon (AP 0,4 15x45 cm) e desinfetados com iodo povidine. Os animais do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina STZ, foi introduzido somente a agulha nas mesmas coordenadas estereotáticas, seguido de aCSF estéril (veículo).

Tabela 1- Coordenadas descritas por Paxinos e Franklin, 2004.

Coordenadas	Ponto 1	Ponto 2
Ântero-Posterior	0,5	0,5
Médio-Lateral	1,1	1,1
Ventral	2,8	2,8

4.4. Protocolo Experimental

Os testes de comportamento foram realizados nos dias 24, 25, 26 e 27 após a primeira injeção de STZ ou de aCSF icv (Imagem 8). Foram utilizados um total de 40 animais divididos em 4 grupos experimentais, cada um com 10 animais, de acordo com a Tabela 2. A cafeína (15 mg/Kg, valor escolhido por ser entre os menores na bibliografia e usado para modelos diabéticos) foi administrada 2h após o segundo dia de cirurgia por via oral (v. o.), e uma vez por dia durante os 25 (vinte e cinco) dias que seguiram após a segunda cirurgia. Os animais realizaram os testes de avaliação da atividade locomotora (teste do campo aberto), aprendizagem e memória (testes do labirinto em Y, esquiva passiva, reconhecimento de objetos) e ansiedade (teste do labirinto em cruz elevada). Após os testes, aos 30 dias após a primeira injeção, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/Kg i.p.) e quetamina

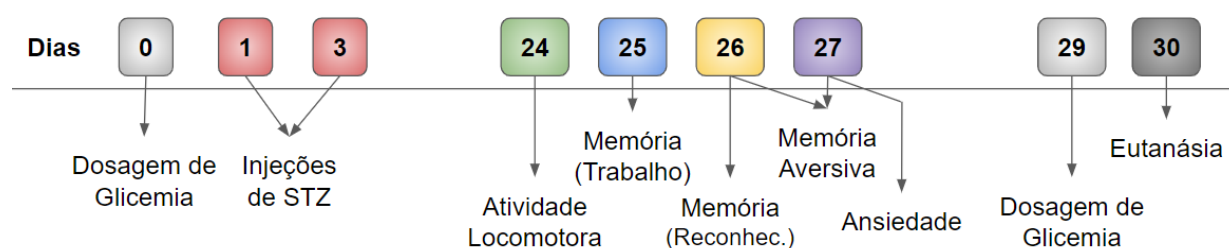
(90 mg/Kg i.p.) e perfundidos com paraformaldeído a 4%, sendo seus cérebros coletados para utilização em outro estudo.

Tabela 2 - Protocolo experimental.

Grupo	Tratamento
1 - aCSF (icv)	Veículo (água destilada v.o.)
2 - aCSF (icv)	Cafeína (15 mg/Kg)
3 - STZ (3 mg/Kg, icv)	Veículo (água destilada v.o.)
4 - STZ (3 mg/Kg, icv)	Cafeína (15 mg/Kg)

Grupo Tratamento 1 aCSF (icv) Veículo (água potável v.o.) 2 aCSF (icv) Cafeína (15 mg/Kg) 3 STZ (3mg/Kg, icv) Veículo (água potável v.o.) 4 STZ (3mg/Kg, icv) Cafeína (15 mg/Kg).

Imagem 8: Desenho experimental utilizado.



4.5. Análise da glicemia

A dosagem da glicemia foi realizada em todos os animais, sendo feita sem restrição alimentar, para confirmar que os animais não estão diabéticos. As dosagens foram feitas um dia anterior às cirurgias e antes da eutanásia dos animais. Com o auxílio de uma lanceta estéril, uma gota de sangue foi obtida através da perfuração da ponta da cauda dos animais. Essa amostra de sangue foi aplicada sobre a fita teste, que foi posteriormente introduzida para leitura no medidor de glicose, sendo os resultados obtidos em mg/dL.

4.6. Testes Comportamentais

Todos os testes comportamentais decorreram em condições de luz de baixa intensidade, com temperatura e umidade controladas. Os aparelhos foram limpos com etanol 20% entre cada animal. O comportamento foi captado em vídeo através de uma câmera USB e analisado em tempo real, ou posteriormente, com o software Any-maze (Stoelting Co., EUA).

4.6.1. Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto

Neste teste é possível avaliar o comportamento exploratório do animal. Foi usado o modelo do Campo Aberto (*Open Field*) BROADHURST (1957) (Imagem 4). O campo aberto consiste de uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm). No teste, o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por cinco (5) minutos, sendo registrados a distância percorrida, velocidade média, número de cruzamentos (*crossings*) e o número de explorações verticais (*rearings*).

Imagem 9 – Aparato de Campo Aberto



Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC)

4.6.2. Avaliação da ansiedade - Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos opostos e dois fechados, também opostos, em forma de cruz. Os braços abertos (30 x 5 cm) e fechados (30 x 5 x 20

cm) são conectados por uma plataforma central (Imagem 5). Os animais foram colocados individualmente no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por cinco minutos. O número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados foram registrados durante 5 minutos. Foram calculadas a porcentagem do tempo e do número de entradas nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência e ao total de entradas nos braços abertos e fechados. Uma diminuição seletiva nos parâmetros correspondentes aos braços abertos revela um efeito ansiogênico (WALF & FRYE, 2007).

Imagem 10: Labirinto em cruz elevado



Fonte: Stoelting Co.

4.6.3. Avaliação da memória de trabalho - Teste Labirinto em Y (Y-maze)

Neste teste, avalia-se a memória operacional ou de trabalho (curto-prazo) visuoespacial, que tem como principal área envolvida, o córtex pré-frontal (SARTER *et al*, 1988). O animal pode alternar espontaneamente entre os braços, quando colocado no final de um dos braços de um labirinto em forma de Y (40 x 35 x 12 cm) (Imagem 6), permanecendo por 8 minutos. Todas as entradas em cada braço são sequencialmente anotadas, de modo a haver um registro do número total de entradas em cada braço, bem como a sequência de entradas. O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos 3 braços, sem repetição, indicando que os animais conseguem lembrar em qual braço eles entraram por

último (LALONDE, 2002). Os dados são expressos como a porcentagem de alternância nos braços sem repetição, obtido através de uma fórmula matemática: Alterações espontâneas (%)=(Número de acertos/Número de entradas-2) x 100.

Imagem 11: Labirinto em Y



Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento

4.6.4. Avaliação da memória de reconhecimento- Teste do Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos é baseado na tendência natural dos animais buscarem o novo (ENNACEUR & DELACOUR, 1988). O teste foi realizado na arena do campo aberto e os animais foram ambientados na sala 24 horas antes da realização do teste. Dois objetos idênticos, localizados em lados opostos, foram colocados nos cantos da arena (BEVINS & BESHEER, 2006). O animal foi colocado no quadrante do meio virado para a parede, no lado oposto aos objetos. O teste foi feito em duas sessões. Na primeira, o animal foi permitido explorar o ambiente por 10 min. Na segunda, realizada uma hora depois, o objeto situado à direita é substituído por um novo objeto, sendo medido o tempo de exploração em cada objeto (antigo e novo) durante 5 minutos. O índice de reconhecimento é calculado como o tempo de exploração do objeto novo menos o tempo de exploração no antigo sobre o tempo total de exploração dos dois objetos. Os seguintes comportamentos são considerados como exploração dos objetos: farejando, lambendo, ou tocando o objeto com o nariz ou com as pernas da frente ou direcionando o nariz para o objeto a uma distância menor que 1cm.

4.6.5. Avaliação da Memória Aversiva- Teste da Esquiva Passiva

O teste de esquiva passiva usa a tendência natural do animal de explorar além da plataforma e envolve o aprendizado de evitar o choque, um componente aversivo que constitui uma resposta condicionada (Imagem 7). Este teste foi baseado no método de De NOBLE e colaboradores (1986) e nos permite avaliar as memórias de curta e longa duração (recente e tardia), assim como a memória com componente aversivo. Os animais foram habituados ao aparelho de esquiva passiva (Ugo Basille® 21025). O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22 cm), tendo este o piso eletrificado e uma plataforma não eletrificada. O animal é colocado na plataforma e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 minuto, e depois retirado. Após 30 segundos, o animal é colocado novamente na plataforma. O animal, ao descer da plataforma, recebe um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para descer sendo registrado, até um máximo de 5 minutos (treino). Retira-se o animal e após 15 minutos este é colocado novamente na plataforma e é registrada a latência de descida (avaliação da memória recente). A retenção do aprendizado (avaliação da memória tardia) foi testada após 24 h, quando o animal for colocado na plataforma e o tempo de latência para a descida da plataforma for registrada, nesta etapa o animal não recebe o choque.

Imagem 12: Aparato de esquiva passiva



Fonte: Insight LTDA.

5. RESULTADOS

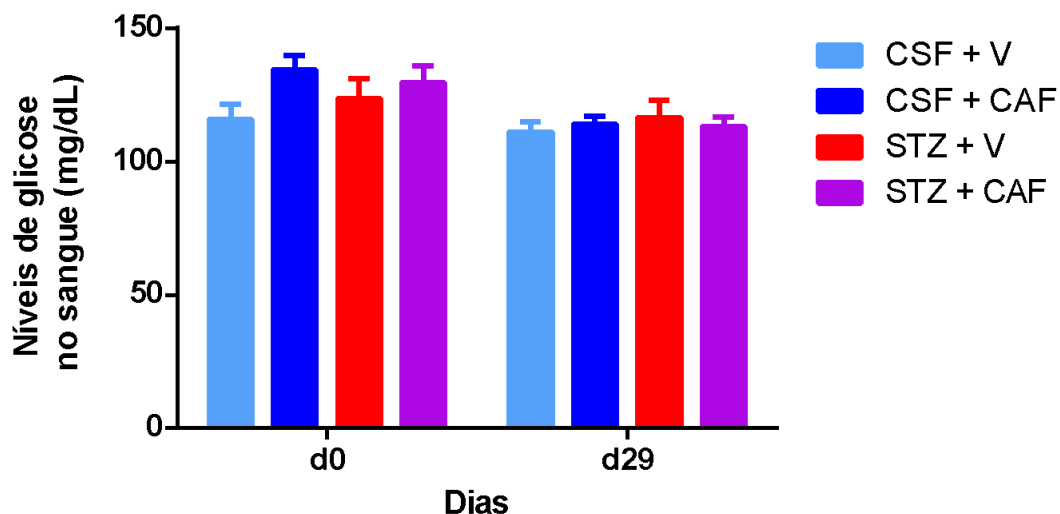
5.1. A injeção intracerebroventricular de STZ não induz alterações nos níveis de glicose periférica

Os resultados obtidos dos níveis de glicose no sangue periférico demonstraram que não houve nenhuma alteração antes e após os procedimentos de indução com STZ e com o tratamento com a cafeína, demonstrando que os animais não estavam diabéticos (Tabela 1). A Figura 1 mostra que os níveis de glicose não foram alterados em nenhum dos grupos experimentais avaliados neste estudo.

Tabela 1 - Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos antes e após 29 dias.

Grupos	d0	d29
aCSF + V	115,8 ± 5,715	111,0 ± 3,765
aCSF + CAF	134,3 ± 5,580	114,1 ± 2,831
STZ + V	123,6 ± 7,755	116,6 ± 6,327
STZ + CAF	129,7 ± 6,330	113,1 ± 3,542

Gráfico 1 – Efeito do tratamento com a cafeína sobre a glicemia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por STZ

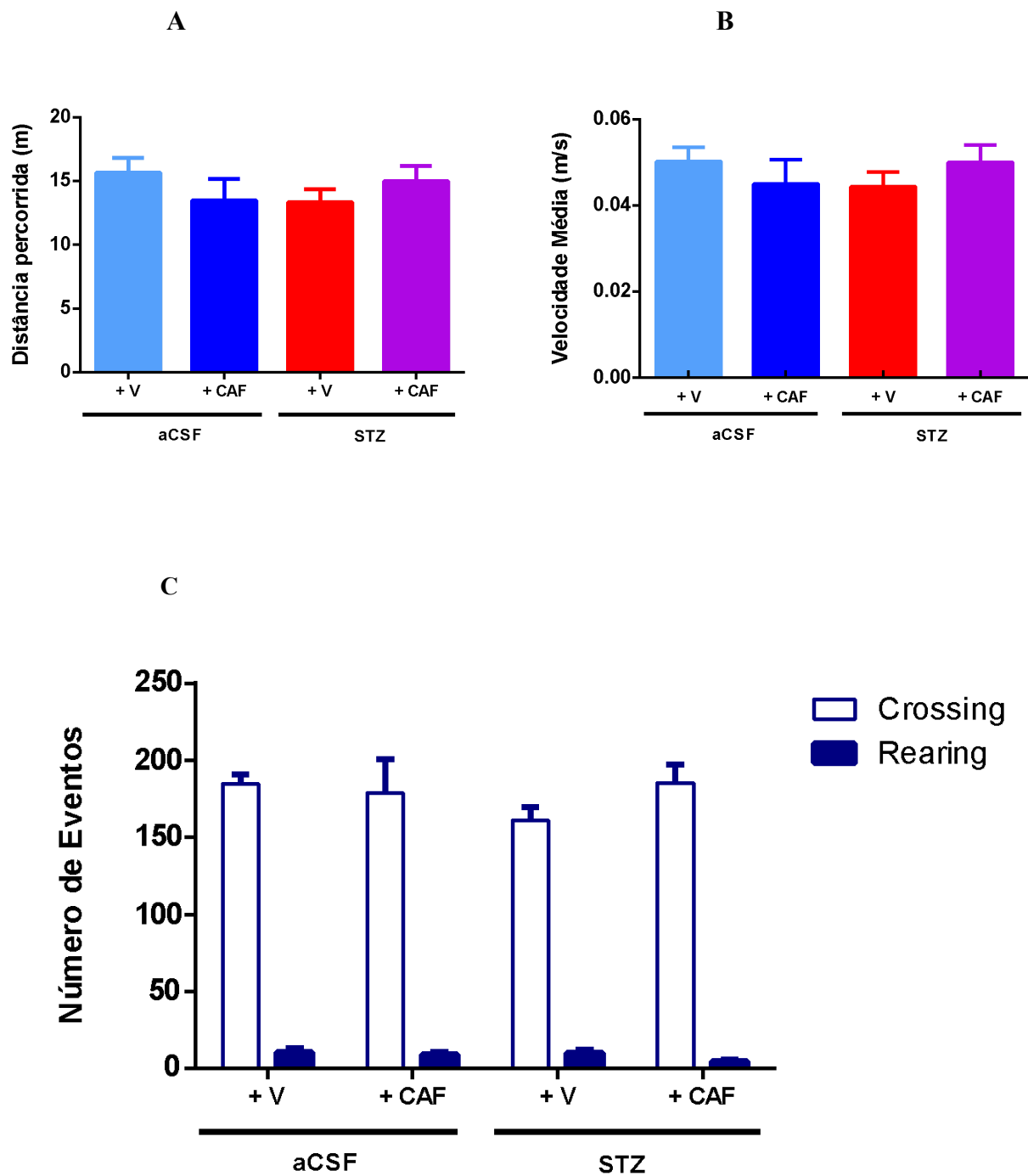


Os animais foram tratados com cafeína (15 mg/Kg, v.o.) durante 26 dias. A análise dos níveis de glicose no sangue dos camundongos (n = 10 animais/grupo) foi feita nos dias 0^o e 29^o, antes dos procedimentos de indução e imediatamente antes do sacrifício dos animais utilizando fitas de glicemia. Os valores estão representados como média \pm EPM. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinhal); V (Veículo – água destilada v.o.); STZ (Estreptozotocina); CAF (cafeína).

5.2. A injeção intracerebroventricular de STZ e tratamento com cafeína não induz alterações na atividade locomotora no teste do campo aberto

Os resultados obtidos no teste do campo aberto demonstraram que não houve nenhuma alteração significativa entre os grupos em relação à distância percorrida (aCSF + V: $15,68 \pm 1,150$ m; aCSF: + CAF: $13,48 \pm 1,687$ m; STZ + V: $13,34 \pm 1,035$ m; STZ + CAF: $14,99 \pm 1,218$ m) (Figura 2A), velocidade média (aCSF + V: $0,0503 \pm 0,003211$ m/s; aCSF: + CAF: $0,0450 \pm 0,005625$ m/s; STZ + V: $0,0444 \pm 0,003410$ m/s; STZ + CAF: $0,0500 \pm 0,00403$ m/s) (Figura 2B) e no número de *crossings* (aCSF + V: $184,8 \pm 5,759$; aCSF: + CAF: $178,8 \pm 21,77$; STZ + V: $161,2 \pm 8,187$; STZ + CAF: $185,5 \pm 11,47$) e *rearings* (aCSF + V: $10,30 \pm 2,650$; aCSF: + CAF: $8,778 \pm 1,441$; STZ + V: $10,10 \pm 1,663$; STZ + CAF: $4,889 \pm 0,7896$) (Figura 2C).

Gráfico 2 – Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) na atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ no teste do campo aberto.

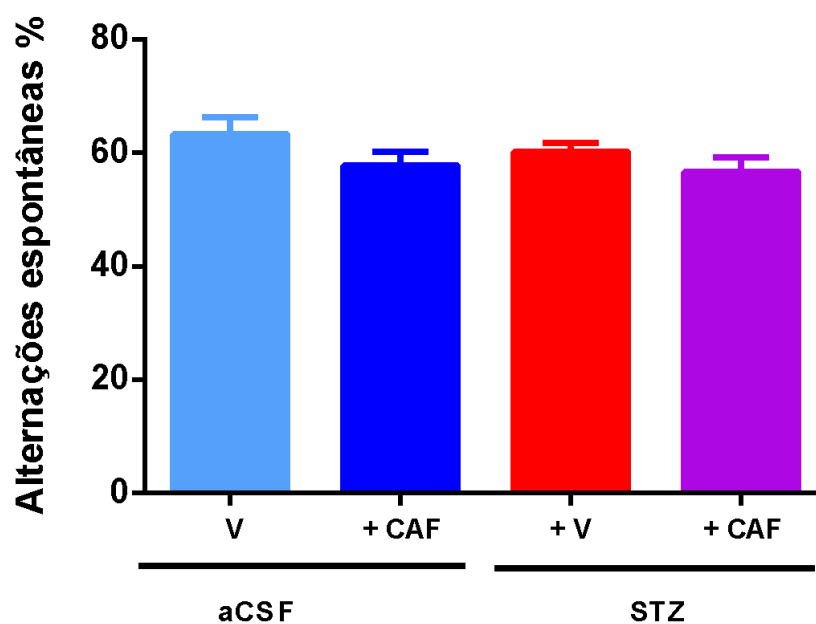


Os animais ($n = 10$ animais/grupo) foram tratados com Cafeína (15 mg/Kg v.o.) durante 26 dias, sendo a distância percorrida (A), velocidade média (B) e o número de *crossings* e *rearings* (C) avaliados pelo software ANYmaze (Stoelting Co., USA) por 5 minutos, 24 dias após a primeira injeção de STZ. Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinhal); V (Veículo – água destilada v.o.); STZ (Estreptozotocina); CAF (cafeína).

5.3. A injeção intracerebroventricular de STZ e tratamento com cafeína não induz alterações na memória de trabalho no teste do labirinto em Y

Na avaliação da memória de trabalho através do teste do labirinto em Y não houve alteração significativa na porcentagem de alternâncias espontâneas entre os grupos (Figura 3).

Gráfico 3 – Efeito do ácido Cafeína (15 mg/Kg v.o.) sobre a memória de trabalho em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.



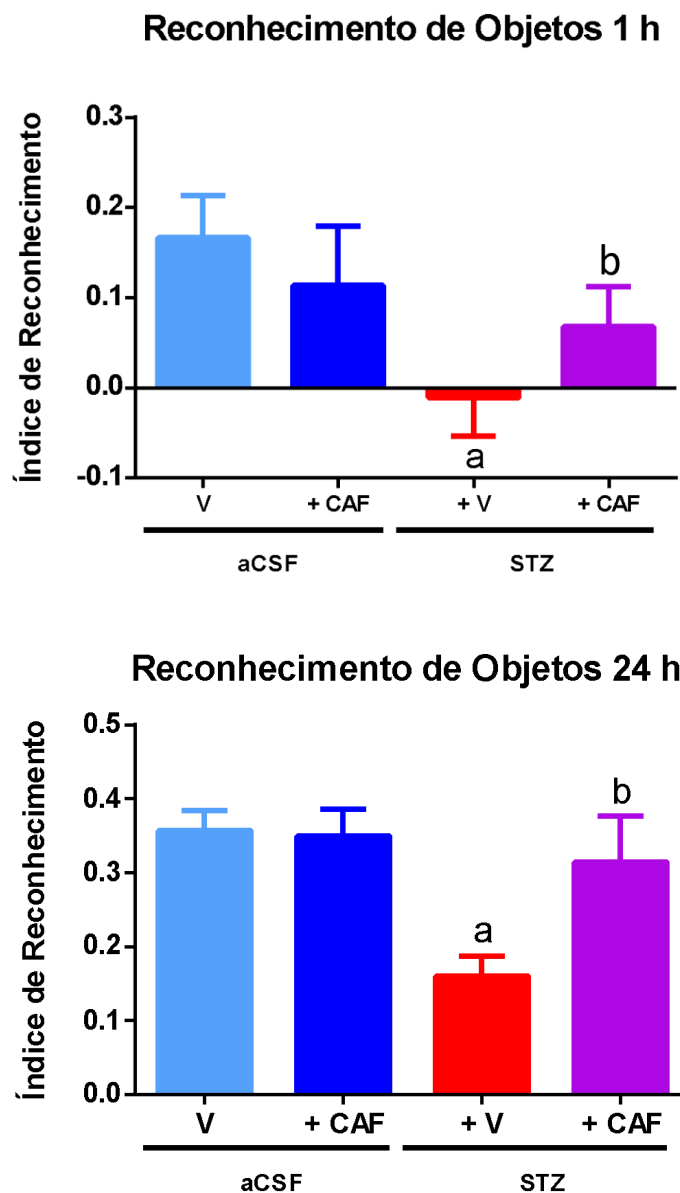
Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/Kg v.o.) durante 26 dias, sendo o número de alternâncias espontâneas contados durante 8 minutos, 24 dias após a primeira injeção de STZ (n = 10 animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinhal); V (Veículo – água destilada v.o.); STZ (Estreptozotocina); CAF (cafeína).

5.4. A cafeína protege animais do déficit de memória de reconhecimento induzido pela injeção intracerebroventricular de STZ no teste do reconhecimento de objetos

Na avaliação do índice de reconhecimento através do teste reconhecimento de objetos, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits na habilidade de reconhecer um novo objeto na exposição após 1 hora (aCSF: $0,17 \pm 0,05$; STZ: $-0,01 \pm 0,04$, $P < 0,01$) e na exposição após 24 horas (aCSF: $0,36 \pm 0,03$; STZ: $0,15 \pm 0,03$, $P < 0,01$) quando

comparados aos animais do grupo aCSF, apresentando menor índice de reconhecimento. O tratamento com a cafeína promoveu uma melhora significativa no índice de reconhecimento do objeto nas exposições após 1 hora (STZ CAF: $0,07 \pm 0,04$, $P < 0,05$) e 24 horas (STZ CAF: $0,3 \pm 0,06$, $P < 0,05$) (Figura 4).

Gráfico 4– Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) sobre a memória de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.



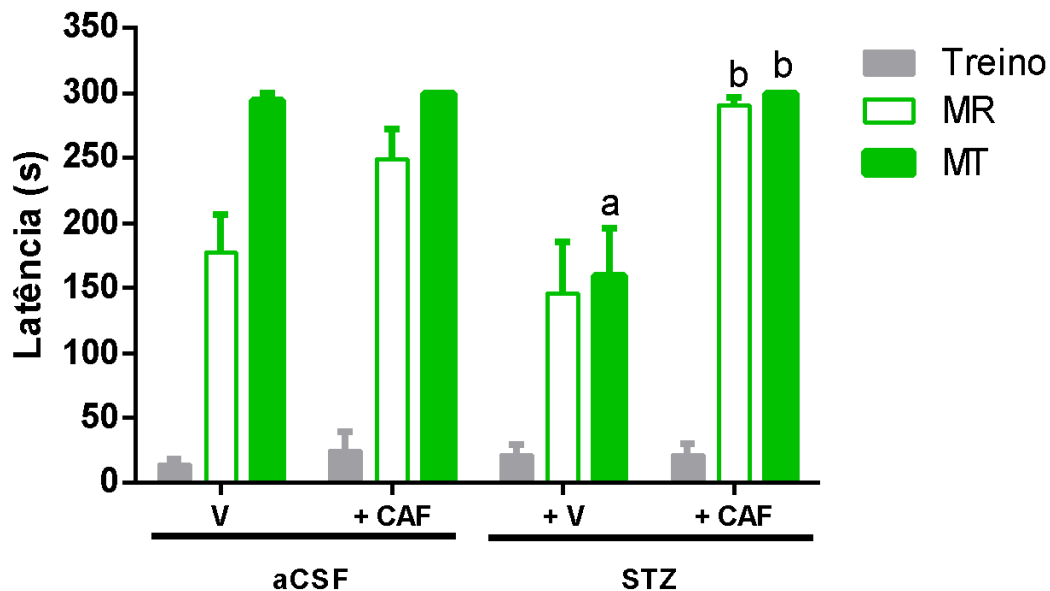
Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/Kg v.o.) durante 26 dias, sendo o índice de reconhecimento analisado 25 dias após a primeira injeção de STZ, 1 h e 24 h após a apresentação dos objetos (n = 10 animais/grupo). Os valores estão representados como média ± EPM. Reconhecimento de objetos após 1 h, ^aP < 0,01 vs aCSF.. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. Reconhecimento de objetos após 24 h, ^aP <

0,01 vs aCSF, ^bP < 0,05 vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinhal); V (Veículo – água destilada v.o.); STZ (Estreptozotocina); CAF (cafeína).

5.5. A cafeína protege animais do déficit de memória aversiva induzido pela injeção intracerebroventricular de STZ no teste da esquiua passiva

Na avaliação da memória aversiva através do teste da esquiua passiva, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits na retenção da memória tardia (MT) (latência, aCSF: $294,5 \pm 5,516$; STZ: $159,4 \pm 36,56$, $P < 0,001$) quando comparados aos animais do grupo aCSF. Este déficit foi protegido pelo tratamento com a cafeína na memória recente (MR) (latência, STZ CAF: $290,4 \pm 5,723$, $P < 0,0001$) e na memória tardia (MT) (latência, STZ CAF: $300,0 \pm 0,00$, $P < 0,0001$) (Figura 5).

Gráfico 5 – Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) sobre a memória aversiva recente e tardia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.



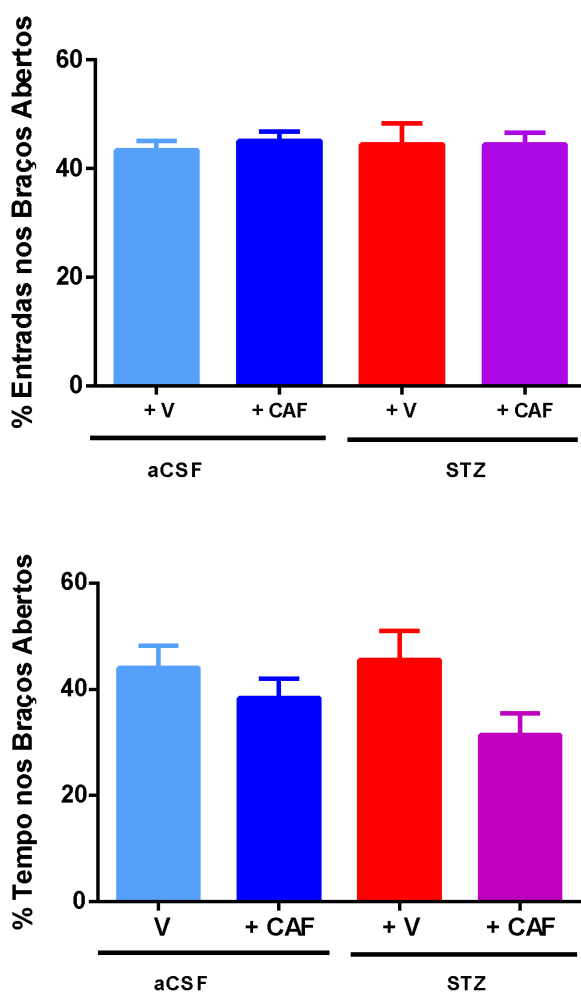
Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/Kg v.o.) durante 26 dias, sendo medido o tempo de latência para o animal descer da plataforma durante sessões de 300 s, realizadas 15 min (memória recente) e 24 hs (memória tardia) após o treino, 26 e 27 dias, respectivamente, após a primeira injeção de STZ (n = 10 animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. Na memória recente: ^aP < 0,05 vs. aCSF. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. Na memória tardia: ^aP < 0,0001 vs. aCSF, ^bP < 0,01 vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. MR (Memória Recente); MT (Memória Tardia);

aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinhal); V (Veículo – água destilada v.o.); STZ (Estreptozotocina); CAF (cafeína).

5.6. A injeção intracerebroventricular de STZ e tratamento com cafeína não induz comportamento do tipo ansioso no teste do labirinto em cruz elevado

Na avaliação da ansiedade através do teste do labirinto em cruz elevado não houve alteração significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos e na porcentagem de tempo nos braços abertos entre os grupos (Figura 6).

Gráfico 6 – Efeito do Cafeína (15 mg/Kg v.o.) sobre o comportamento do tipo ansioso em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.



Os animais foram tratados com Cafeína (15 mg/Kg v.o.) durante 26 dias, sendo medido o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados durante 5 minutos, 27 dias após a primeira injeção de STZ (n = 10 animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinhal); V (Veículo – água destilada v.o.); STZ (Estreptozotocina); CAF (cafeína).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram demonstradas as alterações comportamentais induzidas pela injeção intracerebroventricular de STZ em camundongos no modelo de DAE. O prejuízo na memória e no aprendizado dos animais submetidos à injeção de STZ se evidenciou na piora do desempenho cognitivo desses roedores nos testes comportamentais, de reconhecimento de objetos e da esQUIVA passiva, o que é consistente com estudos anteriores utilizando de tal método (BASSANI *et al.*, 2017; PACHECO *et al.*, 2018).

O consumo de compostos fenólicos está associado a uma variedade de efeitos benéficos para a saúde tais como antioxidante, hipoglicêmico, hipolipidêmicos, anti-inflamatório, imunoestimulante, ansiolítica, neuroprotetora, entre outras (KONO *et al.*, 1998; THOM, 2007; Dos SANTOS *et al.*, 2006; BOUAYED *et al.*, 2007; BASSOLI *et al.*, 2008; CAPPELLETTI *et al.*, 2015). É conhecido que os flavonoides e seus metabólitos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (ANDRES-LACUEVA *et al.*, 2005) e podem exercer ações neurofarmacológicas a nível molecular, influenciando vias de sinalização e expressão gênica (SPENCER, 2008).

O consumo crônico de cafeína em animais diminui o comprometimento da memória ocasionada pelo envelhecimento (GELBER *et al.*, 2011) ou DA (COSTA *et al.*, 2008; CAPPELLETTI *et al.*, 2015). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que não houve nenhuma alteração significativa entre os grupos em relação à distância percorrida, velocidade média e no número de crossings e *rearings*. Estes dados corroboram com estudos que demonstram não haver alteração na atividade locomotora e no comportamento exploratório dos animais que receberam injeção de STZ, excluindo a possibilidade do STZ interferir na atividade locomotora nos testes de memória (PACHECO *et al.*, 2018), e demonstrando que não há déficit motor no modelo animal de DAE. O tratamento com a cafeína também não alterou a atividade locomotora dos animais, em contraste com os resultados de NIKODIJEVIC *et al.*, 1993, onde a atividade locomotora de camundongos tratados com cafeína se tornou menor do que o de controles após o primeiro dia.

O teste do labirinto em Y foi realizado no 22º dia após os procedimentos de indução, não sendo observados déficits na memória de trabalho. Entretanto, estudos anteriores demonstraram que camundongos que receberam STZ obtiveram uma menor porcentagem de alternância espontânea quando comparado com o grupo controle, indicando um déficit na memória de trabalho (QUEIROZ, 2015; SORIAL *et al.*, 2017).

No presente trabalho, a memória de reconhecimento foi avaliada através do teste de reconhecimento de objetos, que se baseia na tendência natural dos animais para explorar preferencialmente objetos novos em detrimento dos familiares em uma arena de campo aberto (ENNACEUR, 1988). A tarefa do reconhecimento de objeto está intimamente relacionada com o bom funcionamento do hipocampo e a codificação, consolidação e recuperação da memória, por sua vez está relacionada com o córtex perirrinal (WINTERS *et al.*, 2008). Os animais que receberam as injeções de STZ apresentaram déficit na memória de reconhecimento na exposição após 1 hora e 24 horas, que foi avaliada 23 dias após as injeções. Estes resultados corroboram com os de estudos recentes, nos quais foram observados déficits significativos na avaliação da memória reconhecimento a partir do teste do reconhecimento de objeto, apresentando menor índice de reconhecimento (BASSANI *et al.*, 2017). A dificuldade na aquisição e retenção de memória neste modelo provavelmente está associada com o prejuízo na sinalização cerebral da insulina induzido pela STZ (CORREIA *et al.*, 2012). O tratamento com a cafeína promoveu uma melhora significativa no índice de reconhecimento de objeto após a exposição de 1 hora e 24 horas, quando comparados com os controles. Na avaliação da memória aversiva através do teste da esQUIVA passiva, os animais submetidos ao modelo de DAE apresentaram déficit na memória recente (MR) e na memória tardia (MT), quando comparados com os controles. Este déficit foi revertido pelo tratamento com a cafeína na memória recente (MR) e memória tardia (MT).

Neste trabalho, ambos a injeção ICV de STZ e o tratamento com a cafeína não induziram comportamento do tipo ansioso, em contraste com os resultados obtidos por EL YACOUBI *et al.*, 2000 e MAHDI *et al.*, 2019. Esta discrepância é provavelmente devido à menor dose de cafeína administrada neste estudo, que foi de 15 mg/Kg, em contraste com as doses de 50 ou 100 mg/Kg e 20 ou 200 mg/Kg administradas nestes estudos, respectivamente; sendo tais efeitos ansiogênicos associados à ingestão de doses maiores de cafeína (CAPPELLETTI *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a cafeína pode agir como neuroprotetora na DAE. Os mecanismos de ação de tal ação neuroprotetora podem ser fundamentados em diferentes fatores, como a inibição da formação de A β no cérebro e as consequentes reduções dos seus níveis no plasma e cérebro, bem como a prevenção da acumulação de A β dentro e em torno de vasos sanguíneos cerebrais e reversão de sua neuropatologia (ARENDASH & CAO, 2010; CAPPELLETTI *et al.*, 2015). A redução de processos inflamatórios pela cafeína, baseada na inibição de fosfodiesterases e o consequente aumento da concentração intracelular de cAMP (CAPPELLETTI *et al.*, 2015; NCBI, 2022),

pode contribuir para o seus efeitos neuroprotetores, sendo a neuroinflamação uma característica de DA e fator relacionado à neurodegeneração associada (STEEN *et al.*, 2005; SAPCANIN *et al.*, 2008; WIRTZ *et al.*, 2013). A sua ação antioxidante e sua capacidade de servir como ativador mitocondrial e estimular a utilização de glicose (ARENDASH & CAO, 2010) podem ser fatores relacionados à seus efeitos neuroprotetores, o que se alinha perfeitamente com o esperado pela hipótese de glicodeprivação cerebral, a qual funciona como forte explicação mecanística para o modelo intracerebroventricular de estreptozotocina utilizado (GRIEB, 2016). O antagonismo dos receptores de adenosina pela cafeína reduz a sua *down*-regulação de dopamina e glutamato, não somente explica os efeitos positivos imediatos da cafeína sobre a capacidade cognitiva, mas também pode justificar indícios de que o seu consumo reduz o risco de desenvolvimento de certas doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson (COSTA *et al.*, 2008; CAPPELLETTI *et al.*, 2015; NCBI, 2022). Este antagonismo ocorre mesmo com pequenas doses de cafeína, fator importante devido ao risco de palpitações e arritmias associados com altas doses da substância, além de ansiedade e agitação (CAPPELLETTI *et al.*, 2015), o que pode limitar o seu uso terapêutico e reduzir a sua efetividade em pessoas com tolerância a esta.

O presente estudo, porém, demonstra a capacidade de doses baixas exercerem seus efeitos benéficos sobre a DA, sem ocasionar as consequências negativas de doses altas.

7. CONCLUSÃO

A cafeína é capaz de proteger camundongos de déficits de memória induzidos pela administração intracerebroventricular de STZ, sugerindo possuir um papel neuroprotetor em perdas cognitivas, podendo ser assim uma possível estratégia neuroprotetora e/ou adjuvante da DA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal, R., Tyagi, E., Shukla, R., & Nath, C. (2011). Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *European Neuropsychopharmacology*, 21(3), 261-273.

Alzheimer A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*. Jan;64:146-8.

Arendash, G. W., & Cao, C. (2010). Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(s1), S117-S126.

Bassoli, B. K., Cassolla, P., Borba-Murad, G. R., Constantin, J., Salgueiro-Pagadigorria, C. L., Bazotte, R. B., ... & de Souza, H. M. (2008). Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 26(3), 320-328.

Bassani, T. B., Turnes, J. M., Moura, E. L., Bonato, J. M., Cópola-Segovia, V., Zanata, S. M., ... & Vital, M. A. (2017). Effects of curcumin on short-term spatial and recognition memory, adult neurogenesis and neuroinflammation in a streptozotocin-induced rat model of dementia of Alzheimer's type. *Behavioural brain research*, 335, 41-54.

Bevins, R. A., & Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature protocols*, 1(3), 1306-1311.

Blokland, A., & Jolles, J. (1994). Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 47(4), 833-837.

Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., & Soulimani, R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the neurological sciences*, 262(1-2), 77-84.

Broadhurst, P. L. (1957). Determinants of emotionality in rat: I. Situational factors. *British Journal of Psychology*, 48(1), 1-12.

Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., & Aromatario, M. (2015). Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug?. *Current neuropharmacology*, 13(1), 71-88.

Castro, D. M., Dillon, C., Machnicki, G., & Allegri, R. F. (2010). The economic cost of Alzheimer's disease: Family or public-health burden?. *Dementia & Neuropsychologia*, 4, 262-267.

Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205-1235.

Correia, S. C., Santos, R. X., Carvalho, C., Cardoso, S., Candeias, E., Santos, M. S., ... & Moreira, P. I. (2012). Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain research*, 1441, 64-78.

Costa, M. S., Botton, P. H., Mioranza, S., Souza, D. O., & Porciúncula, L. O. (2008). Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience*, 153(4), 1071-1078.

Dolan, M. E. (1997). Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. *Advanced drug delivery reviews*, 26(2-3), 105-118.

Dos Santos, M. D., Almeida, M. C., Lopes, N. P., & De Souza, G. E. P. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2236-2240.

Duara, R., Lopez-Alberola, R. F., Barker, W. W., Loewenstein, D. A., Zatinsky, M., Eisdorfer, C. E., & Weinberg, G. B. (1993). A comparison of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43(7), 1377-1377.

El Yacoubi, M., Ledent, C., Parmentier, M., Costentin, J., & Vaugeois, J. M. (2000). The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A_{2A} adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology*, 148(2), 153-163.

Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*, 31(1), 47-59.

Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., ... & Sczufca, M. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The lancet*, 366(9503), 2112-2117.

Förstl, H., & Kurz, A. (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 249(6), 288-290.

Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., & Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 66(2), 137-147.

Frölich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H. G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., ... & Riederer, P. (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, 105(4), 423-438.

Gelber, R. P., Petrovitch, H., Masaki, K. H., Ross, G. W., & White, L. R. (2011). Coffee intake in midlife and risk of dementia and its neuropathologic correlates. *Journal of Alzheimer's disease*, 23(4), 607-615.

Ghareeb, D. A., Mohamed, S., & El-Sayed, M. (2013). The interrelationship between insulin resistance and Alzheimer development.

Godyń, J., Jończyk, J., Panek, D., & Malawska, B. (2016). Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacological Reports*, 68(1), 127-138.

Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *science*, 314(5800), 777-781.

Grieb, P. (2016). Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism. *Molecular neurobiology*, 53(3), 1741-1752.

Hippius, H., & Neundörfer, G. (2022). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*.

Hoyer, S., Müller, D., & Plaschke, K. (1994). Desensitization of brain insulin receptor Effect on glucose/energy and related metabolism. In *Cell and Animal Models in Aging and Dementia Research* (pp. 259-268). Springer, Vienna.

Jack Jr, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., ... & Silverberg, N. (2018). NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535-562.

Kim, J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287-303.

Kono, Y., Kashine, S., Yoneyama, T., SAKAMOTO, Y., MATSUI, Y., & SHIBATA, H. (1998). Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(1), 22-27.

Knopman, D. S., Jones, D. T., & Greicius, M. D. (2021). Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimer's & Dementia*, 17(4), 696-701.

Lalonde, R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 26(1), 91-104.

Lamuela-Raventós, R. M., Romero-Pérez, A. I., Andrés-Lacueva, C., & Tornero, A. (2005). Health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International*, 11(3), 159-176.

Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P., & Pénicaud, L. (1994). Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain research*, 638(1-2), 221-226.

Mahdi, S., Almosawi, S., Baksh, H., Qareeballa, A., Alsaleh, B., Falamarzi, F., ... & Kamal, A. (2019). Effect of chronic administration and withdrawal of caffeine on motor function, cognitive functions, anxiety, and the social behavior of BLC57 mice. *International Journal of Health Sciences*, 13(2), 10.

Maia, L., & De Mendonça, A. (2002). Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease?. *European journal of neurology*, 9(4), 377-382.

Mishra, S. K., Singh, S., Shukla, S., & Shukla, R. (2018). Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. *Neurochemistry International*, 113, 56-68.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 2519, Caffeine. Retrieved December 1, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>.

Nikodijević, O., Jacobson, K. A., & Daly, J. W. (1993). Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44(1), 199-216.

Noble, W., & Gates, A. (1985). Accuracy, latency, and listener-search behavior in localization in the horizontal and vertical planes. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 78(6), 2005-2012.

Pacheco, S. M., Soares, M. S. P., Gutierrez, J. M., Gerzson, M. F. B., Carvalho, F. B., Azambuja, J. H., ... & Spanevello, R. M. (2018). Anthocyanins as a potential pharmacological agent to manage memory deficit, oxidative stress and alterations in ion pump activity induced by experimental sporadic dementia of Alzheimer's type. *The Journal of nutritional biochemistry*, 56, 193-204.

Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Gulf Professional Publishing: San Diego.

Piaceri, I., Nacmias, B., & Sorbi, S. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 5(1), 167–177. <https://doi.org/10.2741/e605>

Prillaman, M. (2022). Heralded Alzheimer's drug works-but safety concerns loom. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-04240-z>

Qiu, C., Kivipelto, M., & Von Strauss, E. (2022). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in clinical neuroscience*.

Salkovic-Petrisic, M., Knezovic, A., Hoyer, S., & Riederer, P. (2013). What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *Journal of neural transmission*, 120(1), 233-252.

Sapcanin, A., Sofic, E., Tahirovic, I., Salkovic-Petrisic, M., Hoyer, S., & Riederer, P. (2008). Antioxidant capacity in rat brain after ICV treatment with streptozotocin and alloxan—a preliminary study. *Neurotoxicity research*, 13(2), 97-104.

Sarter, M., Bodewitz, G., & Stephens, D. N. (1988). Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist β -carbolines. *Psychopharmacology*, 94(4), 491-495.

Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, 8(6), 595-608.

Sharma, M., & Gupta, Y. K. (2001). Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life sciences*, 68(9), 1021-1029.

Shinohara, M., Fujioka, S., Murray, M. E., Wojtas, A., Baker, M., Rovelet-Lecrux, A., ... & Bu, G. (2014). Regional distribution of synaptic markers and APP correlate with distinct clinicopathological features in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Brain*, 137(5), 1533-1549.

Sorial, M. E., & El Sayed, N. S. E. D. (2017). Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 390(6), 581-593.

Steen, E., Terry, B. M., J Rivera, E., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., ... & de la Monte, S. M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes?. *Journal of Alzheimer's disease*, 7(1), 63-80.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research*, 50(6), 537-546.

Thom, E. (2007). The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *Journal of International Medical Research*, 35(6), 900-908.

Twohig, D., & Nielsen, H. M. (2019). α -synuclein in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 14(1), 1-19.

United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2022). *World Population Prospects 2022: Summary of Results*.

van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., ... & Iwatsubo, T. (2022). Lecanemab in early Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*.

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*, 2(2), 322-328.

Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(5), 1055-1070.

Wirz, K. T., Keitel, S., Swaab, D. F., Verhaagen, J., & Bossers, K. (2014). Early molecular changes in Alzheimer disease: can we catch the disease in its presymptomatic phase?. *Journal of Alzheimer's disease*, 38(4), 719-740.