



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JÚLIA DE SOUSA BARROS QUEIROZ

**MODELO DE DEMÊNCIA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA POR
INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA:
AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2015

JÚLIA DE SOUSA BARROS QUEIROZ

**MODELO DE DEMÊNCIA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA POR
INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA:
AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS**

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Área de concentração: Neurociências.

Orientador: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

Coorientador: Profa. Me. Julliana Catharina de Sousa

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- Q42m Queiroz, Júlia de Sousa Barros.
Modelo de demência de alzheimer esporádica induzida por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina: avaliação da memória em camundongos. / Júlia de Souza Barros Queiroz. – 2016.
47f. : il., color.
- Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Biologia, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.
Coorientação: Prof. Me. Julliana Catharina de Sousa.
1. Alzheimer, Doença de. 2. Demência. 3. Memória. I. Título.

JÚLIA DE SOUSA BARROS QUEIROZ

**MODELO DE DEMÊNCIA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDA POR
INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ESTREPTOZOTOCINA:
AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS**

Monografia apresentada à Coordenação do curso de Ciências Biológicas como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

Aprovada em: 08/04/2015.

BANCA EXAMINADORA

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

Ms. Juliana Pereira Fernandes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. David Freitas de Lucena (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai, que me ensinaram que o conhecimento é a melhor herança que se pode ter; e que, diante das adversidades, estiveram ao meu lado e me mostraram o melhor caminho a seguir.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio, sem o qual todo o trabalho desenvolvido e apresentado nesta monografia não teria sido possível. No entanto, também foi necessária a presença de várias pessoas que ao longo desta pesquisa estiveram direta ou indiretamente contribuindo para a sua realização. É com enorme prazer que aqui expresso toda minha gratidão para com todas elas.

A Deus, que iluminou o meu caminho e me deu sabedoria para chegar até aqui.

À minha família, Cristina Pinheiro e Jorge Queiroz, por sempre estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis e por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava, bem como por me mostrarem o quanto o estudo e o esforço são importantes. A eles, toda a minha gratidão.

À minha coorientadora, a Profa. Ms. Julliana Catharina, por ter me ajudado desde o início da minha experiência no Laboratório de Neurociências e por ter estado comigo durante todo o projeto da monografia. Por todo o conhecimento e momentos maravilhosos, minha gratidão.

A todos os integrantes do Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC – Fortaleza-CE), gostaria de expressar minha gratidão e meu respeito pelos ensinamentos diários, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência e desespero com minha vida universitária. É maravilhoso fazer parte desse grupo de pesquisa e trabalhar com amigos tão maravilhosos, cuja presença transforma qualquer trabalho laboratorial, por mais desgastante que seja, em um momento de alegria e boas recordações. Obrigada a todos, principalmente a Marta Carmo, Analu Aragão, Juliana Pereira e Ana Paula, que estiveram sempre à disposição para tirar minhas dúvidas frequentes durante a realização desta monografia.

Quero também deixar algumas palavras de gratidão às minhas amigas do coração, Amanda Aragão, Cecília Licarião, Priscila Caracas e Sarah Sant'Anna, por terem feito esses anos de graduação os melhores e mais importantes da minha vida, sem vocês esse caminho não teria sido tão maravilhoso. Obrigada pelas risadas, pelos momentos maravilhosos e pelo companheirismo. Amo muito vocês!

À maravilhosa turma de Ciências Biológicas de 2010.1, que me fizeram companhia e compartilharam comigo o seu amor pela ciência. Obrigada a todos!

À Professora Geanne Matos de Andrade, a quem não podia deixar de agradecer, pela orientação durante todos esses anos no laboratório. Agradeço pelos conhecimentos

transmitidos, os quais permitiram desenvolver não só a minha capacidade crítica, como também aumentar o meu interesse e conhecimento nesta área.

A todos, muito obrigada!

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”(Martin Luther King)

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência que afeta indivíduos a partir dos 65 anos. No Brasil, estima-se que em 2025 atinja 1 milhão e 200 mil pessoas. A DA é caracterizada pelo comprometimento cognitivo, incluindo a perda da memória, deposição de placas senis e emaranhados neurofibrilares intracelulares. Atribui-se essas alterações, em parte, a uma deficiência na sinalização da insulina e consequente resistência. A estreptozotocina (STZ) é utilizada na indução de *Diabetes mellitus* e sua administração intracerebroventricular (ICV) sugere relação com DA. O presente estudo objetivou padronizar o modelo de demência de Alzheimer esporádica induzida pela injeção intracerebroventricular de estreptozotocina e avaliar o seu efeito na memória de camundongos. Foram utilizados camundongos Swiss machos divididos em dois grupos: Veículo, injetado com fluido cérebrospinal (CSF); e Demência esporádica, injetado com STZ. Os animais foram anestesiados com xilazina 10 mg/kg e ketamina 90 mg/kg para a realização da cirurgia estereotáxica nos dias 1 e 3, seguindo as coordenadas: $\pm 1,5$ mm (ML); $\pm 3,6$ mm (DV); $\pm 0,9$ mm (AP). A STZ, na dose de 3 mg/kg por dia, totalizando 6 mg/kg nos dois dias, foi injetada, em cada ponto, o total de 10 μ l nos dois dias; e o CSF foi injetado totalizando 10 μ l nos dois dias. Os testes comportamentais foram realizados quinze dias após a segunda administração de STZ, sendo realizados dois esquemas de teste, grupo A e grupo B. No grupo A, foram avaliadas a memória de trabalho e a memória episódica através do teste do labirinto em Y e o teste do reconhecimento de objeto. No grupo B, foi avaliada a memória espacial através do teste do labirinto aquático de Morris. Os animais STZ não apresentaram alterações na atividade locomotora comparados ao grupo CSF. Os animais STZ apresentaram déficits quando comparados aos animais CSF nas tarefas do Y-maze, reconhecimento de objetos e labirinto aquático. Os resultados demonstram que a estreptozotocina compromete a memória de trabalho, espacial e episódica, produzindo um bom modelo experimental para as alterações cognitivas de DAE.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer. Estreptozotocina. Demência. Memória.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia affecting individuals 65 years of age. In Brazil, it is estimated that in 2025 reached 1 million 200 thousand people. AD is characterized by cognitive impairment including memory loss, deposition of senile plaques and intracellular neurofibrillary tangles. Attributed to these changes, in part, to a deficiency in insulin signaling and consequent resistance. The streptozotocin (STZ) is used in the induction of Diabetes Mellitus and its intracerebroventricular (ICV) administration suggests a relationship with AD. This study aimed to standardize the sporadic Alzheimer's disease model induced by intracerebroventricular injection of streptozotocin and evaluate the effect on mice memory. Swiss male mice were divided into two groups; Vehicle, injected with cerebrospinal fluid (CSF), and sporadic dementia, injected with STZ. The animals were anesthetized with xylazine 10 mg / kg ketamine and 90 mg / kg for performing stereotaxic surgery on days 1 and 3 following coordinates: ± 1.5 mm (ML); ± 3.6 mm (DV); ± 0.9 mm (AP). The STZ in a dose of 3 mg / kg per day, totaling 6 mg / kg two days was injected at each point total of 10 L two days and injected into the CSF was also 10 μ l total of two days. Behavioral tests were performed 15 days after the second administration of STZ, and performed two test schemes, group A and group B. In group A, was assessed working memory and episodic memory through the maze test in Y and the Test object recognition. In group B, was assessed spatial memory through the Morris water maze test. The STZ animals showed no changes in locomotor activity compared to CSF group. The STZ animals showed deficits compared to CSF animals in the Y-maze task, object recognition and water maze. The results demonstrate that streptozotocin compromises the working memory and episodic space, producing a good experimental model for cognitive EAD.

Key-words: Alzheimer's disease. Streptozotocin. Dementia. Memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações morfológicas características da DA.....	16
Figura 2 – Secretases que clivam a substância beta-amiloide.....	18
Figura 3 – Fórmula molecular da Estreptozotocina.....	21
Figura 4 – Provável mecanismo de ação da STZ na célula.....	22
Figura 5 – Injeção de estreptozotocina nos ventrículos laterais com a seringa de Hamilton.....	27
Figura 6 – Protocolo experimental.....	28
Figura 7 – Labirinto em Y.....	29
Figura 8 – Labirinto Aquático de Morris (<i>Water-maze</i>).....	30
Figura 9 – Arena para teste de reconhecimento de objeto.....	31
Figura10 – Gráfico da avaliação da memória de trabalho através do calculo da porcentagem de alterações espontâneas.....	32
Figura11 – Gráfico da avaliação da memória de trabalho através do numero de entradas em cada braço do labirinto em Y	33
Figura12 – Gráfico da avaliação da memória episódica através do tempo total de exploração.....	34
Figura13 – Gráfico da avaliação da memória episódica através do índice de reconhecimento de retenção.....	34
Figura14 – Gráfico da avaliação da memória episódica através do índice de preferência de retenção.....	35
Figura15 – Gráfico da avaliação da memória espacial através do tempo de latência.....	36
Figura16 – Gráfico da avaliação da memória espacial através do tempo no quadrante na retenção	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas descritas por Sharma and Gupta, 2001	27
Tabela 2 – Grupos do protocolo experimental	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE	Acetilcolinesterase
ANOVA	<i>Analisis of Variance</i> (Análise de Variância)
APP	Proteína Precursora de Amilóide
A β	Beta Amilóide
DA	Doença de Alzheimer
DAF	Doença de Alzheimer Familiar
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
GLUT	Transportador de Glicose
GAD	Glutamic Acid Decarboxylase
GSK3	Enzima Glicogênio Sintase Cinase 3
IGF	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
ICV	Intracerebroventricular
i.p.	Injeção Intraperitoneal
IR	Receptor de Insulina
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
NFT	Emaranhados Neurofibrilares
PI3	Cinase fosfatidil-inositol 3
PS1	Presenilinas 1
PS2	Presenilinas 2
P13K	Enzima fosfatidilinositol-3 cinase
PKB	Proteína cinase B
STZ	Estreptozotocina
SRI	Substrato do Receptor de Insulina
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Epidemiologia do Alzheimer	14
1.2	Descrição da Doença de Alzheimer	15
1.3	Fisiopatologia do Alzheimer	17
<i>1.3.1</i>	<i>Cascata Amiloide</i>	17
<i>1.3.2</i>	<i>Estresse oxidativo</i>	18
1.4	Metabolismo da glicose	19
1.5	Modelos de Doença de Alzheimer em animais	20
<i>1.5.1</i>	<i>Modelo de demência de Alzheimer induzida por injeção STZ</i>	20
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Animais	26
4.2	Indução do modelo de demência de Alzheimer esporádica	26
4.3	Avaliação da memória	28
<i>4.3.1</i>	<i>Avaliação da memória de trabalho-Labirinto em Y (Y-maze)</i>	28
<i>4.3.2</i>	<i>Avaliação da memória espacial- Teste do Labirinto Aquático (Morris, 1984)</i>	29
<i>4.3.3</i>	<i>Avaliação da Memória Episódica(Teste de reconhecimento de objeto)</i>	30
<i>4.3.4</i>	<i>Análise estatística</i>	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Efeitos da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre o déficit na memória de trabalho e na atividade locomotora de camundongos submetidos à cirurgia estereotáxica	32
5.2	Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre o déficit na memória episódica de camundongos submetidos à cirurgia estereotáxica	33
5.3	Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre o déficit na memória espacial de camundongos submetidos à cirurgia	

	estereotática	35
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA), descrita em 1907 por Alois Alzheimer, é uma doença neurodegenerativa progressiva e é a causa mais comum de síndrome demencial, sendo responsável por aproximadamente 60-70% de todos os casos de demência. Sua prevalência aumenta com a idade: cerca de 1% no grupo etário de 60- 64 anos e 24-33% naqueles com idade superior a 85 anos. (GAMELLI *et al.*, 2013).

O envelhecimento populacional vem ocorrendo no mundo todo. O Brasil, antes considerado um país jovem, hoje conta com um grande número de pessoas acima dos 60 anos de idade, por isso, os idosos já correspondem a cerca de 8,6% da população brasileira. (POTTER, 2015).

Dados epidemiológicos mostram um crescimento mundial na incidência de demência, particularmente do tipo Alzheimer, e especialmente nos chamados países em desenvolvimento. Há uma estimativa de que haja 23,4 milhões de pessoas com algum tipo de demência no mundo, com um aumento em torno dos 4,6 milhões ao ano. (FERRI *et al.*, ANO *apud* RODRIGUES, 2010).

É esperado que, à medida que ocorre um aumento da expectativa de vida dos indivíduos, aumente também a ocorrência de doenças associadas ao envelhecimento. Pode-se dizer que, de uma maneira ou de outra, todos estão ou estarão expostos às consequências da demência em suas vidas. Previsões apontam um crescimento astronômico dos casos de demência, especialmente DA, entre a população acima de 60 anos em todo o mundo. (LANGA *et al.*, 2004).

Do ponto de vista da saúde pública, as demências constituem um dos grandes desafios atuais e futuros. Isso se deve à elevada frequência e à enorme repercussão econômica que provocam, transformando-se na terceira enfermidade de maior custo depois das doenças cardiovasculares e do câncer. Estima-se que, no ano de 2005, mundialmente, foram gastos diretamente US\$ 210 bilhões com cuidados aos pacientes com demência (WIMO, A; JONSSON, L.; WINBLAD, B., 2007) e tem-se questionado se será possível tratar e cuidar do crescente número de pessoas com essa enfermidade. (LOVESTONE, 2002).

1.2 Descrição da Doença de Alzheimer

A apresentação mais comum da DA é o déficit de memória que envolve uma dificuldade na aprendizagem e na evocação de informações recentemente aprendidas. Esse sintoma evolui insidiosamente e progride lentamente ao longo do tempo. (GAMELLI *et al.*, 2013). Tal fato leva a doença a ser um grave problema de saúde pública e um enorme custo para os governos.

A perda de memória dificulta a aproximação das pessoas em suas relações afetivas, sociais e familiares. (ROZENTHAL; ENGELHARDT; LAKS, 1995). Sem lembrar-se de fatos, de lugares e de pessoas, diz-se que há menos da pessoa afetada a cada dia, a qual fica impossibilitada de se relacionar, cuidar de si, planejar sua qualidade de vida, assim como perde sua razão, autonomia e coerência. (KAR *et al.*, 2004).

A DA pode se apresentar de duas maneiras. A primeira é a chamada Doença de Alzheimer Familiar – DAF, que ocorre geralmente antes dos 65 anos, sua progressão é mais acelerada e é caracterizada pela perda de memória, mudanças comportamentais, déficits de julgamento e de fluência verbal, tendo um grande impacto no ambiente familiar. (HEGER, 2014). A segunda é a Doença de Alzheimer Esporádica – DAE, que representa a maioria dos casos e cujo maior fator de risco é o envelhecimento, que é o objetivo do presente estudo.

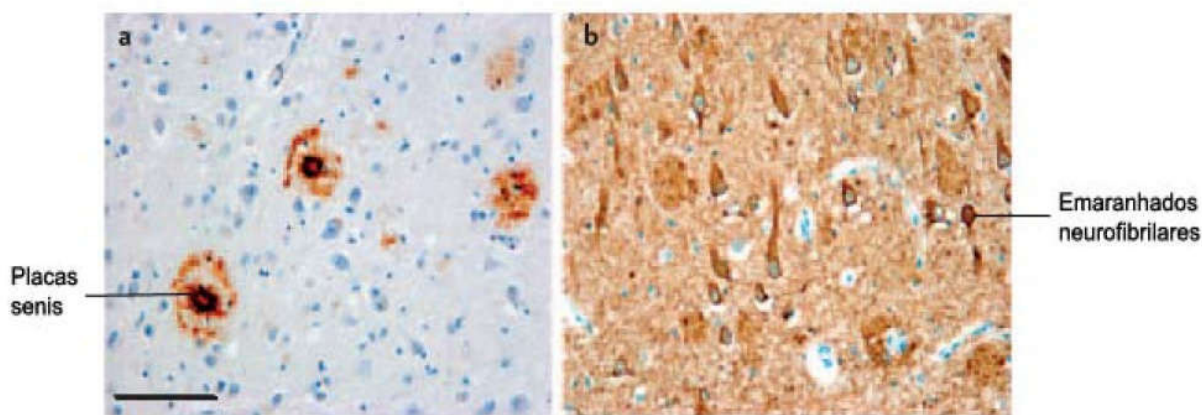
Dentre os principais fatores de risco correlacionados com a ocorrência da DA, estão a idade e a predisposição genética. Observa-se, entretanto, que a maioria dos casos de DA são esporádicos, ou seja, apenas 5% dos pacientes têm a Doença de Alzheimer Familiar – DAF, uma forma incomum que tende a ocorrer mais cedo. (ZHAGN; LI, 2014).

Foram também apontados como fatores associados à DA a ocorrência de diabetes mellitus, de hiperlipidemia e ainda o uso de tabaco. Dentre os fatores preventivos, estão a dieta mediterrânea, a atividade física, o desenvolvimento da escolaridade, a ingestão de ácido fólico e o consumo moderado de álcool. A existência de evidências para tais associações, porém, é baixa na literatura médica. (SCARMEAS *et al.*, 2009; MARTHA *et al.*, 2011).

A patologia da DA constitui um quadro complexo, envolvendo a combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais. Estudos genéticos demonstram que mutações nas presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2) e na APP (Proteína Precursora Amiloide), localizadas nos cromossomos 14, 1 e 21, respectivamente, estão associadas à forma familiar da Doença de Alzheimer de início precoce (FAD – *Familial Alzheimer's Disease*). (PUGLIELLI; TANZI; KOVACS, 2003).

Histopatologicamente, a doença caracteriza-se por uma extensa perda neuronal, com presença das chamadas placas senis que são formadas pelo depósito extracelular do peptídeo beta-amiloide e por emaranhados neurofibrilares intracelulares (Figura 1), resultantes da deposição anormal de uma proteína associada aos microtúbulos, a proteína tau, hiperfosforilada ou poliubiquitinada. (SELKOE, 2001).

Figura 1 – Alterações morfológicas características da DA. a) Placas senis constituídas por depósitos extracelulares do peptídeo beta-amiloide. b) Emaranhados neurofibrilares constituídos por agregados intracelulares pela forma hiperfosforilada da proteína tau.



Fonte: HAASS; SELKOE (2007). (adaptada).

Associada a essas características morfológicas em particular, ocorre uma série de eventos que levam à disfunção neuronal, especialmente de neurônios colinérgicos, em áreas relacionadas à cognição e à formação de memórias, como o córtex pré-frontal e o hipocampo, juntamente com suas regiões associadas, levando a uma atrofia nessas áreas. (GENG; LUO, 2014).

Assim, cria-se um quadro de desequilíbrio neuroquímico, caracterizado por sinais de neurodegeneração, neuroinflamação, estresse oxidativo, aumento da sinalização pró-apoptótica, déficit colinérgico e disfunção mitocondrial, com o prejuízo da transmissão sináptica e do equilíbrio entre diferentes neurotransmissores. (SELKOE, 2001; EIKELENBOOM *et al.*, 2006).

O diagnóstico de DA é baseado primariamente em características clínicas apontadas na anamnese e em um exame clínico detalhado, especialmente neurológico e psiquiátrico. Exames laboratoriais e de neuroimagem devem ser utilizados no diagnóstico

diferencial entre a DA e outras demências. (FROTA *et al.*, ANOapud GAMELLI *et al.*, 2013).

Dentre os tratamentos atuais da DA, estão as intervenções psicossociais (Terapia Ocupacional, Fonoaudiologia, Fisioterapia e Psicologia) e as farmacológicas, as quais utilizam os fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), os anticolinesterásicos – donepezil, rivastignina e galantamina, que aumentam a disponibilidade da acetilcolina na fenda sináptica, e os fármacos antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA – memantina. Esses medicamentos são incapazes de bloquear a progressão da doença, mas melhoram a qualidade de vida do paciente, existindo, assim, uma grande busca por novas alternativas terapêuticas que possam ser capazes de atuarem diretamente no processo neurodegenerativo da DA. (JAHNS *et al.*, 2012; RITTER, 2012).

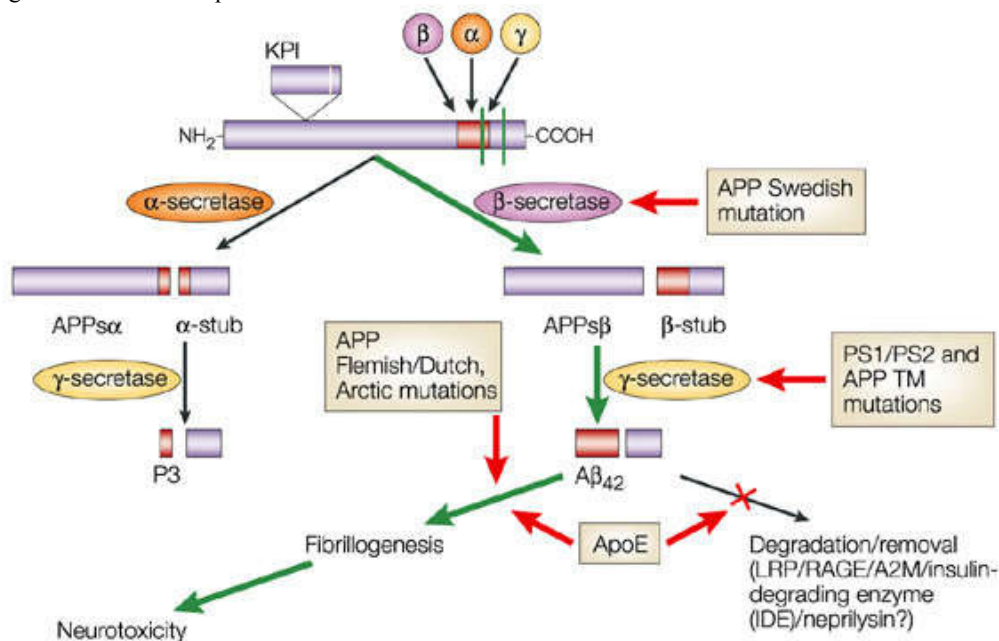
1.3 Fisiopatologia do Alzheimer

1.3.1 Cascata Amiloide

Durante as últimas décadas, muitas hipóteses foram geradas para explicar a fisiopatologia da DA. A Hipótese da Cascata Amiloide considera como ponto chave, no desenvolvimento da doença, os efeitos neurotóxicos do beta-amiloide, pois o acúmulo das formas solúveis desse peptídeo leva à toxicidade sináptica e à neurotoxicidade, ocasionando a quebra da homeostase do cálcio, a indução de estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial. (XIAN-HUI *et al.*, 2014).

Na Doença de Alzheimer, a neurodegeneração, a partir da “hipótese da cascata amiloide”, inicia-se com a clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (APP) e resulta na produção, agregação e deposição da substância beta-amiloide (A β), bem como na consequente formação de placas senis. Em condições normais, o beta-amiloide é degradado por enzimas (secretases) (Figura 2) e retirado do encéfalo através de um balanço entre efluxo e influxo, mediados pela proteína receptora de LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade) e receptores para produtos finais de glicosilação avançada. Na DA, um desbalanço entre a produção e o clearance do beta-amiloide levam ao depósito de oligômeros deste peptídeo no espaço extracelular, o que pode levar a um estresse oxidativo na célula. (GELLA; DURANY, 2009).

Figura 2 – Secretases que clivam a substância beta-amiloide.



Nature Reviews | Neuroscience

Outra característica histológica de DA são os emaranhados neurofibrilares (NFT) que são formados a partir da degeneração do citoesqueleto neuronal decorrente da hiperfosforilação da proteína tau. (GONZALEZ-DOMINGUEZ; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA, 2014).

1.3.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado como um desbalanço entre a produção de radicais livres e a capacidade da célula de se defender contra eles. (HALLIWELL, 2006b). A mitocôndria é a principal fonte de espécies reativas e de defesas antioxidantes nas células; nessa organela, são gerados os ânions superóxido no espaço intermembrana pelo vazamento de elétrons, que se combinam com o oxigênio molecular no complexo III da cadeia de transporte de elétrons, em um processo que é dependente do potencial de membrana e na matriz mitocondrial, através de um local não definido do complexo I. (CADENAS; DAVIES, 2000; HAN; WILLIAMS; CADENAS, 2001).

O crescimento de relatos clínicos e experimentais mostra que o estresse oxidativo pode desempenhar um papel importante na degeneração neuronal em doenças como a DA, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Huntington. (MÖLLER, 2010; ALIEV *et al.*, 2013). O estresse oxidativo se manifesta na DA por meio da presença de proteínas oxidadas, de produtos de glicosilação avançada, da peroxidação lipídica e da formação de espécies tóxicas, tais como peróxidos, álcoois, aldeídos, carbonilas, cetonas e de modificações oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial. (GELLA; DURANY, 2009).

O alto consumo de oxigênio e o baixo nível de antioxidantes no cérebro resultam em uma suscetibilidade maior do tecido cerebral ao dano oxidativo. (HALLIWELL, 2006a). Além disso, muitas evidências sugerem que as mitocôndrias tenham um papel central em doenças neurodegenerativas, em razão de seu papel na regulação da morte celular. (MICHAEL; LIN; FLINT, 2006).

Na mitocôndria, o beta-amiloide reduz o potencial de membrana mitocondrial, inibe a cadeia transportadora de elétrons, diminui a taxa respiratória e induz a liberação de espécies reativas, favorecendo a ocorrência de apoptose (Figura 2). (ALIEV *et al.*, 2013).

O aumento de espécies reativas de oxigênio na DA está relacionado à oxidação de cadeias laterais de proteínas. Os grupos carbonilas são introduzidos nas proteínas pela oxidação da hidroxila dos aminoácidos de cadeia lateral dentro de derivados de aldeídos e cetonas, levando à carbonilação dessas proteínas.

Estudos recentes demonstraram um aumento na quebra do DNA em cérebros de pacientes com DA. Essa descoberta pode ser explicada pelo aumento de espécies reativas de oxigênio no cérebro, induzindo ao influxo de cálcio via receptores de glutamato, desencadeando uma toxicidade cerebral. Esse processo pode culminar com a morte celular. (BUTTERFIELD *et al.*, 2007).

Acredita-se que todos esses processos estejam interligados e que um desequilíbrio nessas funções possa estar envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas. (VILA; RAMONET; PERIER, 2008). O estresse oxidativo foi implicado na progressão da DA, ocasionando a perda progressiva de populações de células neuronais específicas e associando-se com a formação de agregados de proteína, contribuindo para patogênese da doença.

1.4. Metabolismo da glicose

Vários estudos têm mostrado a importância da glicose como principal nutriente do cérebro, documentado seu metabolismo e controle, bem como mostrado que regiões cerebrais relacionadas com aprendizado e memória, tais como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal exibem aumento da utilização de glicose, evidenciada por estudos que utilizam técnicas de tomografia por emissão de positrons. Além disso, esses estudos têm indicado que a insulina afeta várias funções cerebrais. (HOYER, 2003).

A relação entre doença de Alzheimer esporádica e o metabolismo da glicose encefálica tem sido considerada em parte pelo fato de pacientes com diabetes mellitus (DM) apresentarem comprometimento cognitivo, especialmente pacientes idosos com DM tipo 2, cujo principal fator é a resistência à insulina. (BIESSELS; KAPPELLE, 2005). Apesar da insulina ser produzida em grande parte pelas células beta pancreáticas e atravessar a barreira hematoencefálica, ela também pode ser produzida localmente, em algumas regiões do cérebro como hipocampo, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e bulbo olfatório (HOYER, 2003). Além disso, o receptor de insulina (IR) também é encontrado em várias áreas encefálicas como bulbo olfatório, hipotálamo, córtex cerebral e hipocampo. (HENNEBERG; HOYER, 1995).

A sinalização da insulina é mediada por duas vias de transdução: a via da quinase fosfatidil-inositol 3 (PI3 quinase) e a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase), que controlam a captação de glicose pelas células. (JOHNTSON *et al.*, 2003).

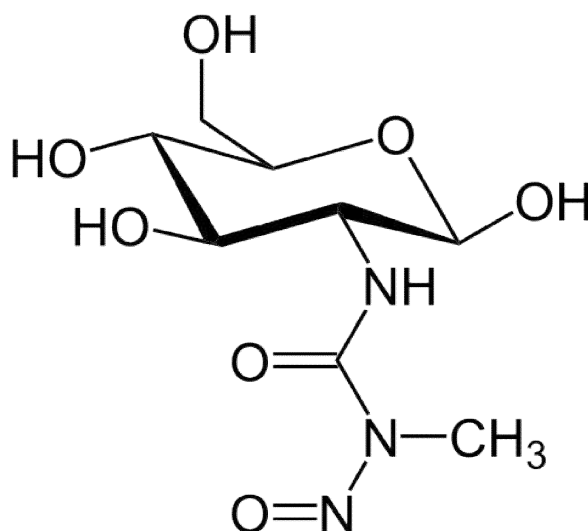
1.5 Modelos de Doença de Alzheimer em animais

Existem diversos modelos animais que visam a mimetizar algumas características neuroquímicas e comportamentais apresentadas na DA do tipo esporádica através de algum dos diversos caminhos que levam ao seu estabelecimento. Dentre esses modelos, tem-se os classificados como não transgênicos, por não envolverem manipulação dos genes envolvidos diretamente na DA, sendo eles a infusão intracerebroventricular (ICV) direta do peptídeo beta-amilóide (LOPES *et al.*, 2010), a destruição neurotóxica do núcleo basal e suas eferências colinérgicas corticais (SWAROWSKY *et al.*, 2008), oclusão permanente e bilateral das carótidas comuns, causando uma hipoperfusão cerebral crônica (VICENTE *et al.*, 2007) e o modelo por injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina, nosso objeto de estudo.

1.5.1 Modelo de demência de Alzheimer induzida por injeção STZ

A estreptozotocina (STZ) (Figura 2) é uma droga de origem antibiótica utilizada experimentalmente para induzir diabetes, principalmente em roedores. Para isso, é administrada via sistêmica e age no pâncreas, destruindo permanentemente as células beta pancreáticas produtoras de insulina, originando assim um quadro de diabetes (BAYDAS *et al.*, 2003). No pâncreas, na dose em que a STZ é administrada (50 mg/kg), o mecanismo de ação consiste na captação de STZ pelas células beta através de transportadores de glicose (GLUT) do tipo 2.

Figura 3 – Fórmula molecular da estreptozotocina.



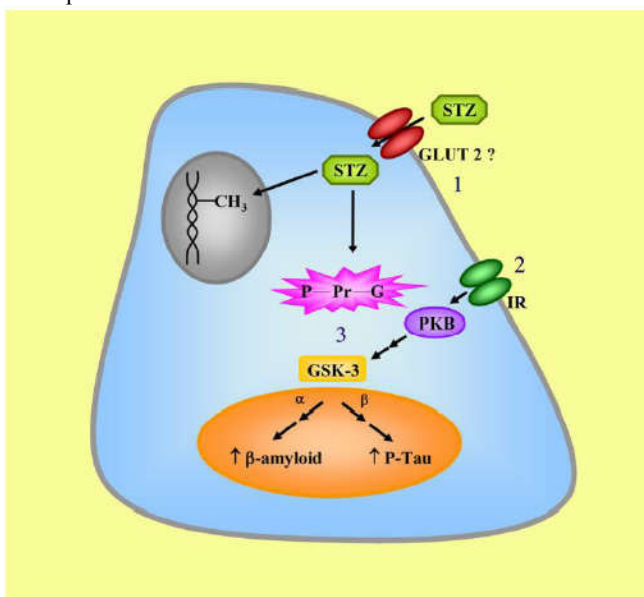
Quando administrada via intracerebroventricular (ICV), em dose bem menor que a utilizada para indução da diabetes (1-3 mg/kg), a estreptozotocina (STZ) causa uma espécie de dessensibilização dos receptores de insulina (RI) e dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), ambos do tipo tirosina cinase, com consequentes alterações bioquímicas e fisiopatológicas semelhantes às encontradas na demência do tipo Alzheimer. Por essa razão, tem sido amplamente aceita para produzir um modelo experimental para a DA. (HOYES *et al.*, ANO *apud* DE LA MONTE, 2009). Como a estreptozotocina não atravessa a barreira hematocefálica, não ocorre comprometimento sistêmico quando injetada intracerebroventricular.

Estudos indicam que a deficiência ou estado de resistência de insulina encefálica são características tanto do quadro tardio da doença de Alzheimer do tipo esporádica, quanto do próprio mecanismo patogênico da doença, com o aumento do quadro de resistência conforme a patologia progride. (BAYDAS *et al.*, 2006).

O mecanismo de deficiência no funcionamento do receptor de insulina (RI) está diretamente relacionado com a transdução de sinal do RI. Resumidamente, quando a insulina se liga ao seu receptor, tanto central como periférico, este recruta seu substrato (SRI) no sítio de ancoramento, tornando-o fosforilado nos resíduos de tirosina. Este, por sua vez, torna-se capaz de recrutar várias moléculas sinalizadoras, dentre estas a enzima fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K). (POTTER, 2014). Esta enzima fosforila o fosfoinotidide da membrana que ancora a proteína cinase B (PKB), a qual promove a translocação do receptor de glicose GLUT 4 para a membrana plasmática, promovendo maior aporte de glicose nos tecidos dependentes de insulina. Por outro lado, a PKB também modula por fosforilação a atividade da enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK 3), que, dependendo da sua isoforma, regula os peptídeos beta-amiloide e a fosforilação da proteína tau. (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006).

Além disso, o receptor GLUT 2, por onde a estreptozotocina parece atuar também no SNC, está localizado em áreas específicas do encéfalo, isto explica as semelhanças em alterações hipocampais. Este provável mecanismo de ação está ilustrado na Figura 2. (POTTER, 2014).

Figura 4 – Provável mecanismo de ação da STZ na célula. 1. Entrada através do transportados de glicose 2 (GLUT 2). 2. Ação sobre o receptor de insulina (IR). 3. Comprometimento da via da enzima GSK 3.



Fonte: Rodrigues *et al.* (2010) (adaptado).

O mau funcionamento do RI resulta também na redução do metabolismo energético cerebral com consequente estresse oxidativo, o que se reflete em disfunções cognitivas, devido, entre outros fatores, à inibição da formação de ATP e acetil-CoA. (ISHRAT *et al.*, 2006). Também foram demonstrados comprometimentos de aprendizagem e memória, como também a redução dos níveis da enzima acetiltransferase, devido à falta de acetil-CoA, também no hipocampo, o que leva a uma interferência na transmissão colinérgica. (ISHRAT *et al.*, 2006).

Trabalhos demonstram que a injeção ICV de STZ em dose subdiabetogênica reduz de 10 a 30% os níveis de glicose no córtex cerebral e no hipocampo, com diminuição significativa das principais enzimas da via glicolítica. (MICHAŁOWSKA-WENDER *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

À medida que a expectativa de vida torna-se mais elevada, especialmente em países desenvolvidos, tem-se observado um aumento da prevalência da DA. Atualmente, estima-se haver cerca de 35,5 milhões de pessoas com demência no mundo. Este número praticamente irá dobrar a cada 20 anos, chegando a 65,7 milhões em 2030 e a 115,4 milhões em 2050. (HEGER, 2014).

A DA certamente tem um início muito mais precoce, talvez com manifestações subclínicas, que ocorrem décadas antes do surgimento das claras alterações cognitivo-comportamentais da doença, com a evolução do quadro clínico. (CAVALCANTI; ENGELHARDT, 2012). O quadro clínico apresenta alterações cognitivas e comportamentais, principalmente relacionadas ao comprometimento da memória episódica e espacial. (MENCHOLA; WEISS, 2015). Pela pouca quantidade de modelos eficazes, é importante o desenvolvimento de novos modelos que mimetizam a doença, para que, a partir deles, novas substâncias neuroprotetoras sejam descobertas. Deste modo, este trabalho se propõe a padronizar o modelo de demência de Alzheimer esporádica, avaliando os déficits cognitivos que esta doença apresenta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar o modelo de demência de Alzheimer esporádica (DAE) em camundongos, cuja memória será avaliada.

3.2 Objetivos específicos

- Induzir o modelo de demência de Alzheimer esporádica com a injeção intracerebroventricular de estreptozotocina.
- Avaliar a memória dos animais com DAE, por meio dos testes de Labirinto em Y (memória de trabalho), Labirinto Aquático (memória espacial) e Reconhecimento de Objeto (memória episódica).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram usados camundongos machos, adultos, da estirpe *Swiss*, com peso compreendido entre 25 a 35 gramas. Os animais mantiveram-se alojados em gaiolas de plástico, à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com um ciclo circadiano de 12 horas de claro e escuro, 60% de umidade relativa e livre acesso a comida e água.

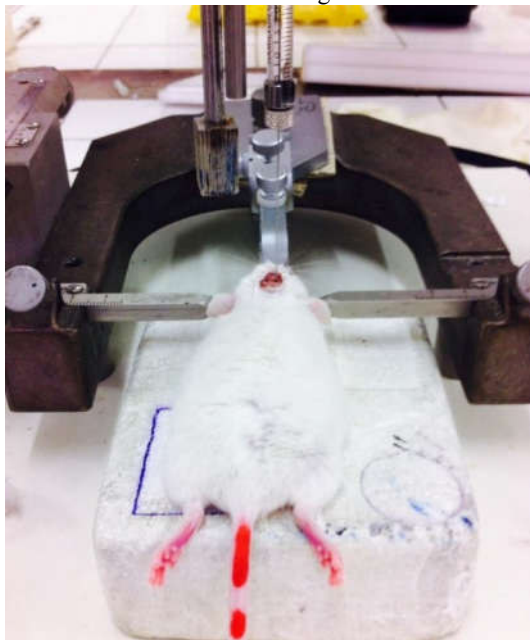
Todas as experiências foram realizadas durante a fase de luz do ciclo, e os animais estavam acostumados às instalações de alojamento por, pelo menos, uma semana antes de qualquer tratamento.

4.2 Indução do modelo de demência de Alzheimer esporádica

Os procedimentos de lesão foram realizados através de cirurgia estereotáxica. Os animais do grupo falso-operado foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina STZ, foi somente introduzido à agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas, seguido de infusão de fluido cerebrospinal (CSF) estéril (Tabela 2). Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg via intraperitoneal, i.p.) e quetamina (90 mg/kg via intramuscular, i.p.) e posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting®). Foi realizada uma incisão de aproximadamente 2 centímetros de comprimento com um bisturi, no alto do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o bregma. Três coordenadas de acesso ao corpo estriado foram marcadas de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1984) (Tabela 1). O modelo experimental de lesão foi proposto por Lannert (1998).

Foram realizadas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação (Dremel), permitindo entrada da seringa *Hamilton* com a estreptozotocina diretamente nos ventrículos laterais (Figura 4). As lesões foram feitas em ambos os ventrículos. Os animais receberam duas microinjeções, duas vezes em ambos os grupos, em dias alternados. Em cada dia, os animais receberam doses de STZ de 3mg/kg, totalizando 6mg/kg nos dois dias. Os pontos onde foi injetada a toxina situam-se nas coordenadas descritas na Tabela 1.

Figura 5 – Injeção de estreptozotocina nos ventrículos laterais com a seringa de *Hamilton*.



Fonte: Elaborada pelos autores (2015).

Após as injeções, os cortes foram suturados com fio cirúrgico de algodão (AP 0,4 15x45 cm) e o local foi desinfetado com povidine.

Tabela 1 – Coordenadas descritas por Sharma and Gupta, 2001.

	Ponto 1	Ponto 2
ANTERO-POSTERIOR	0,8	0,8
MÉDIO-LATERAL	+1,5	1,5
VENTRAL	+4,0	+4,0

Fonte:

Tabela 2 – Grupos protocolo experimental

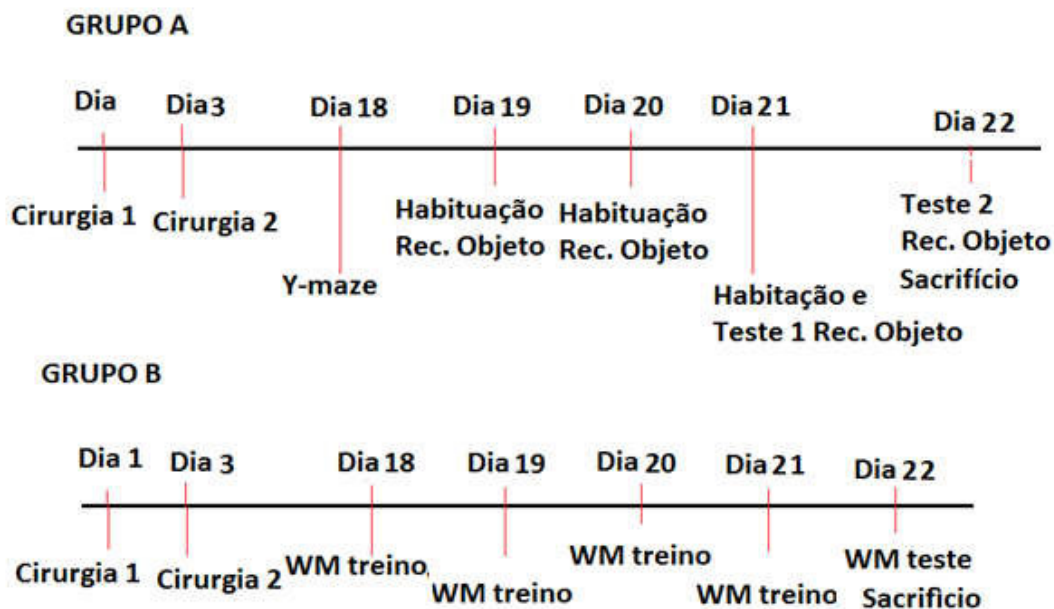
GRUPO	TRATAMENTO
1	STZ (6mg/kg, 20 μ L intracerebroventricular) + veículo
2	CSF + Veículo(CSF)

Fonte:

4.3 Avaliação da memória

Os testes de comportamento foram realizados 15 dias após a segunda injeção de STZ, e os animais foram divididos em dois grupos: Grupo A e grupo B, conforme o protocolo experimental na Figura 6.

Figura 6 – Protocolo experimental.



Fonte: Elaborada pelos autores (2015)

No grupo A, foram realizados os testes do labirinto em Y (*Y-maze*), para avaliar a memória de trabalho, e o teste do reconhecimento de objeto, avaliando a memória episódica.

No grupo B, foi realizado o teste do labirinto aquático de Morris (*water-maze*), para avaliar a memória espacial. Depois do teste, os animais foram sacrificados.

4.3.1 Avaliação da memória de trabalho-Labirinto em Y (*Y-maze*)

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada através do teste do labirinto em Y (Figura 7). Nesse teste, o animal é colocado em um labirinto em forma de Y, com três braços de madeira, cada um com 16 centímetros de altura, 5 centímetros de largura e 40 centímetros de comprimento (Figura 7) (SARTER *et al.*, 1988). Os animais apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes.

Para a avaliação da memória, os braços foram numerados. O animal foi colocado no aparelho e, durante oito minutos, as sequências dos braços nos quais os animais entraram foram anotadas. Foi considerado acerto cada vez que o animal entrou em três diferentes braços sem repetição. O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática:

$$\text{Alternações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de acertos}}{\text{Número total de entradas} - 2} \times 100$$

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (STONE *et al.*, 1991). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.

Figura 7 – Labirinto em Y



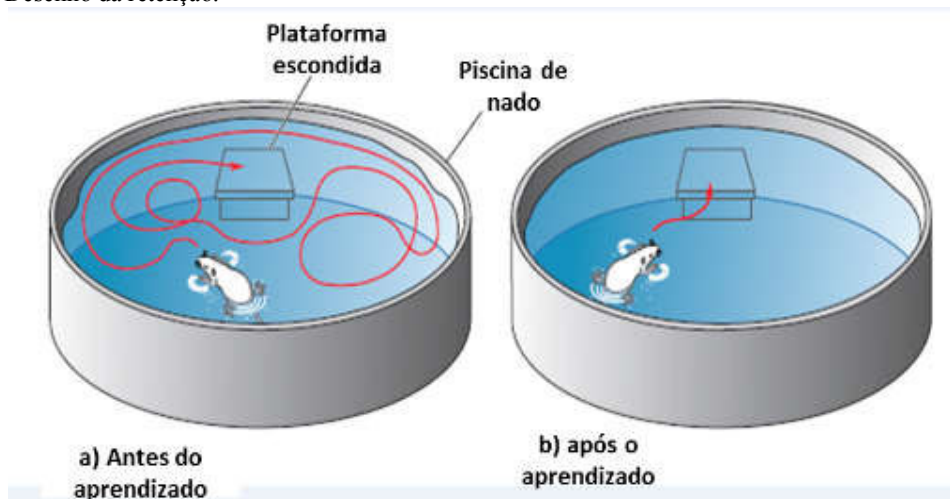
Fonte: Elaborado pelos autores. (2015).

4.3.2 Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático (Morris, 1984)

O animal foi colocado de forma aleatória em uma piscina circular (90 centímetros de diâmetro e 60 centímetros de profundidade) contendo água turva (até 30 centímetros de altura) com tinta preta não tóxica, à temperatura de 26 °C, dividida espacialmente em quatro quadrantes, de forma que o animal deve encontrar uma plataforma (sete centímetros de diâmetro) submersa dois centímetros. O animal teve 60 segundos para achar a plataforma (que

permaneceu no mesmo local em todos os treinos) e lá permaneceu por dez segundos (Figura 8). Este treino foi realizado quatro vezes por dia com intervalos de trinta segundos entre os treinos, durante três dias consecutivos (aprendizagem). Vinte e quatro horas após o último treino, os animais foram submetidos ao teste, agora sem a plataforma, para avaliar a retenção da memória. O animal permaneceu na piscina por sessenta segundos, e foi registrado o tempo em que o animal se posiciona no quadrante em que a plataforma deveria estar, o tempo de latência para encontrar o local da plataforma e o número de vezes em que ele cruzar o local exato da plataforma.

Figura 8 – Labirinto aquático de Morris. (*Water-maze*) a) Desenho do início do aprendizado (treinos). b) Desenho da retenção.

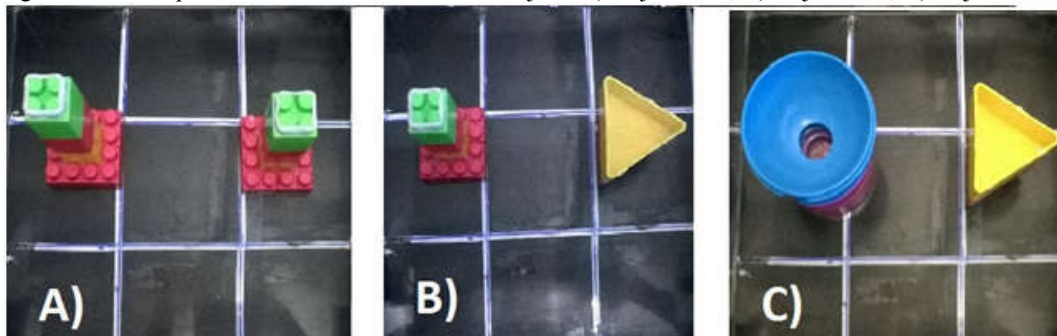


4.3.3 Avaliação da memória episódica (teste de reconhecimento de objeto)

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado quinze dias após a segunda injeção STZ. A arena experimental consistiu de uma caixa quadrada (diâmetro de 80 centímetros de altura \times 30 centímetros de lado) com paredes pretas de acrílico. Dois dias antes dos testes, os animais foram habituados na arena por 10 minutos por dia, com três camundongos no máximo, tempo que pode minimizar o medo do ambiente desconhecido. No dia do experimento, cada animal ficou três minutos habituando novamente. Dois objetos idênticos, A e A, respectivamente, foram colocados na arena, onde os animais foram colocados individualmente, e o tempo total gasto explorando os dois objetos foi registrada durante cinco minutos. O comportamento exploratório foi considerado quando o camundongo dirigiu o nariz para o objeto a uma distância de menos de 2 centímetros e/ou tocar o objeto

com o nariz. Uma hora depois, um dos objetos A foi substituído por um B, desconhecido. Em seguida, o animal foi colocado novamente na arena, onde pôde explorar o espaço por mais cinco minutos, em julgamento de retenção. Depois de 24 horas, intervalo de retenção, os camundongos foram colocados novamente na caixa, com o objeto A substituído por um objeto C. Os camundongos foram deixados a explorar livremente durante cinco minutos e os objetos foram alternados entre as posições da esquerda e da direita, para reduzir o viés potencial de uma preferência de local. Os dois objetos foram colocados em posição simétrica, em torno de quinze centímetros de distância da parede preta. Quaisquer fezes e urina foram removidos com toalhas de papel, e o chão foi limpo com etanol (20%) depois de cada ensaio individual para eliminar sugestões olfativas. O tempo de exploração para cada objeto na aquisição e ensaios de retenção foi gravada. O índice preferencial (PI) foi calculado da seguinte forma: [tempo gasto exploração do objeto novo / tempo total de exploração]. O índice de discriminação (DI) foi assim calculado: [(tempo a explorar o novo objeto - tempo a explorar o objeto familiar) / tempo total de exploração]. Os objetos A, B e C e a arena estão ilustrados na Figura 9.

Figura 9 – Arena para teste de reconhecimento de objeto. A) Objeto A/A; B) Objeto A/B; C) Objeto B/C.



Fonte: Elaborada pelos autores (2015).

4.3.4 Análise estatística

Foram realizados testes não paramétricos (Kruskall-Wallis e Mann-Whitney) para a análise estatística dos testes comportamentais, sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão da média. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$. O programa de computador usado foi GraphPadPrism® 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre o déficit na memória de trabalho e na atividade locomotora de camundongos submetidos à cirurgia estereotáxica.

A injeção intracerebroventricular de estreptozotocina na dose de 3 mg/kg provocou déficits na memória de trabalho no grupo STZ, mostrando uma diminuição significativa na porcentagem de alterações espontâneas do grupo STZ em relação ao grupo CSF (Figura 10) (CSF: $73,25 \pm 2,34$; STZ: $54,44 \pm 3,12$). Em relação ao número de entradas em cada braço do labirinto em Y, não houve diferença significativa entre os grupos, mostrando que não há déficit motor no modelo (Figura 10) (CSF: $41,75 \pm 2,00$; STZ: $43,67 \pm 3,99$).

Figura 10 – Gráfico da avaliação da memória de trabalho através do cálculo da porcentagem de alterações espontâneas (n=8) * vs CSF $p < 0,05$. Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm EPM.

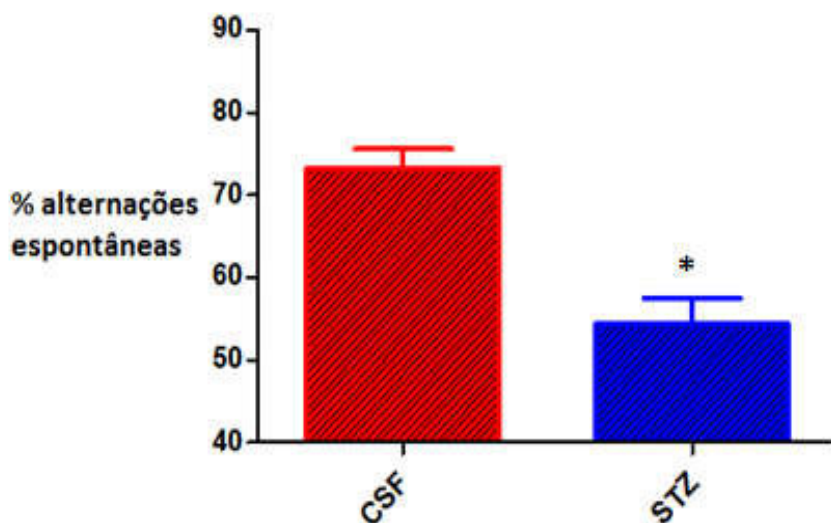
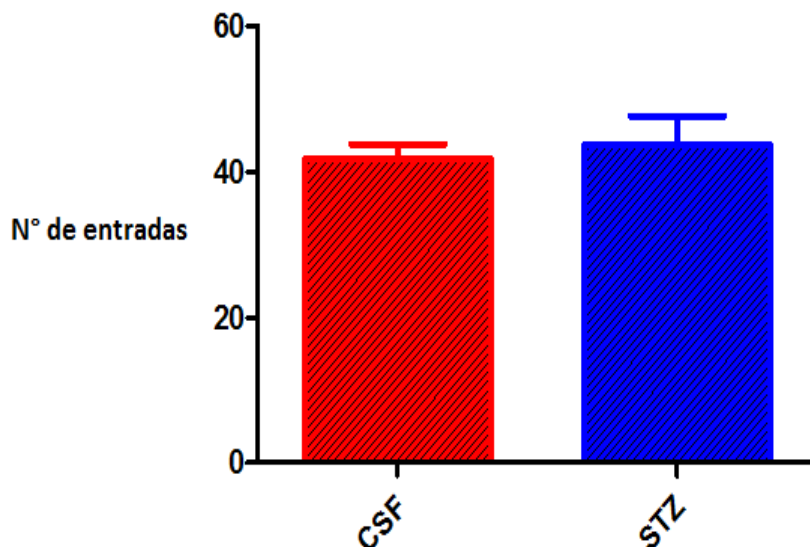


Figura 11 – Gráfico da avaliação da atividade locomotora através do número de entradas em cada braço do labirinto em Y (n=8). ANOVA, Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm EPM.



5.2. Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre o déficit na memória episódica de camundongos submetidos à cirurgia estereotáxica.

No teste do reconhecimento de objeto, em relação ao parâmetro tempo total, que mostra o tempo que cada grupo explorou os objetos na arena, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 12) (CSF: $88,38 \pm 4,32$; STZ: $109,8 \pm 11,96$). Porém, avaliando o índice de reconhecimento de retenção, houve diferença significativa entre CSF e STZ ($p < 0,05$) (Figura 13) (CSF: $0,26 \pm 0,09$; STZ: $0,07 \pm 0,04$), mostrando que a injeção intracerebroventricular de estreptozotocina provocou déficits na memória episódica. Podemos ver esse déficit também quando avaliamos o índice de preferência de retenção, o qual também mostrou diferença entre os grupos (Figura 14) (CSF: $0,630 \pm 0,04$; STZ: $0,54 \pm 0,01$).

Figura 12 – Avaliação da memória episódica através do tempo total de exploração (n=8). ANOVA, Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm EPM.

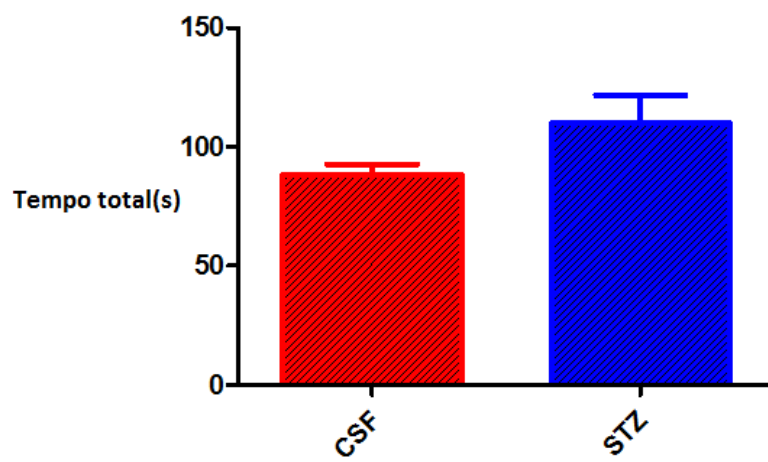


Figura 13 – Gráfico da avaliação da memória episódica através do índice de reconhecimento de retenção (n=8) * vs CSF $p < 0,05$. ANOVA, Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm EPM.

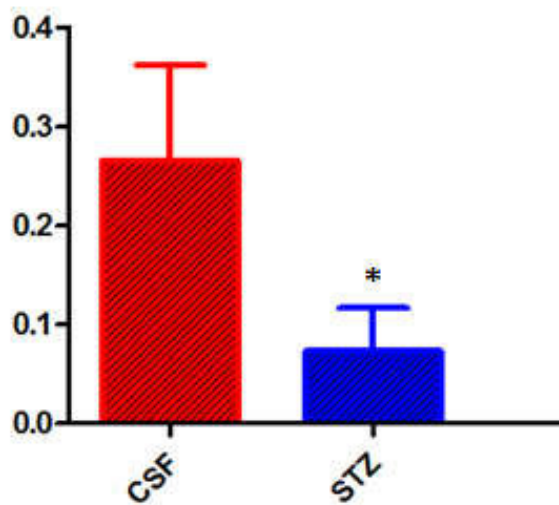
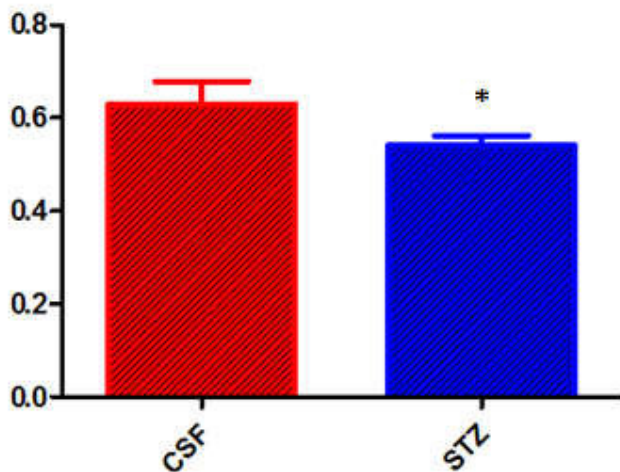


Figura 14 – Gráfico da avaliação da memória episódica através do índice de preferência de retenção (n=8) * vs CSF p<0,05. ANOVA, Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm EPM.



5.3 Efeito da injeção intracerebroventricular de estreptozotocina sobre o déficit na memória espacial de camundongos submetidos à cirurgia estereotáxica.

No teste do labirinto aquático de Morris, foram avaliados os seguintes parâmetros: latência, tempo que o animal leva para encontrar o local em que a plataforma se encontrava na retenção, e tempo no quadrante, isto é, o tempo que o animal permaneceu no quadrante em que a plataforma estava. Analisando a latência, foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 15) (CSF: 11,13 \pm 4,23; STZ: 22,50 \pm 4,870). O tempo no quadrante também mostrou diferença significativa entre os grupos STZ e CSF (Figura 16) (CSF: 30,38 \pm 1,253; STZ: 21,33 \pm 1,70).

Figura 15 – Gráfico da avaliação da memória espacial através do tempo de latência na retenção (n=8) * vs CSF $p < 0,05$. ANOVA, Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm EPM.

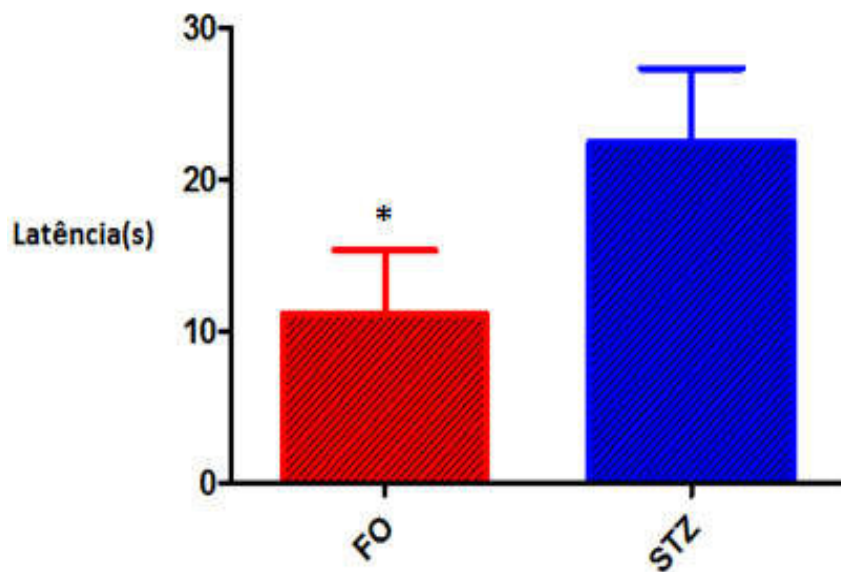
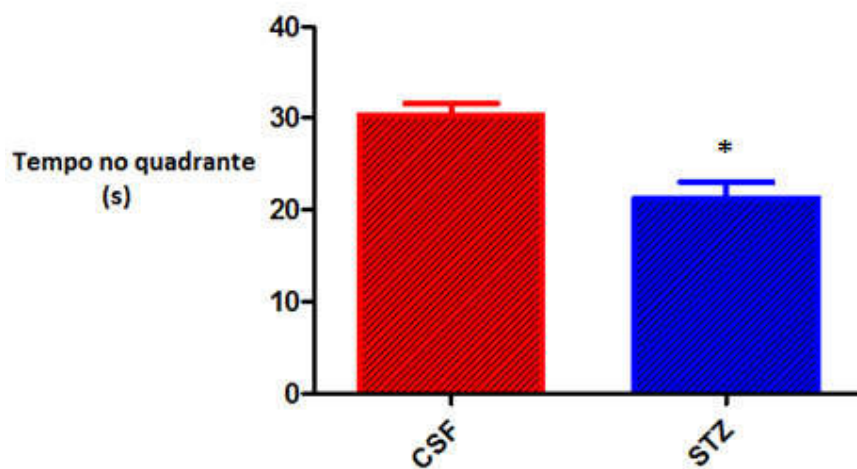


Figura 16 – Gráfico da avaliação da memória espacial através do tempo no quadrante na retenção (n=8) * vs CSF $p < 0,05$. ANOVA, Testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm EPM.



6. DISCUSSÃO

A estreptozotocina (STZ) possui uma estrutura química muito semelhante à da glicose, com diferença apenas em uma substituição da hidroxila por um grupo nitrosureia no Carbono 2. Essa semelhança torna possível que a droga seja carregada para dentro da célula através do transportador GLUT 2 (LELOUP *et al.*, 1994). O STZ é uma droga tóxica às células pancreáticas produtoras de insulina (WILSON; LEITER, 1990) e aos receptores de insulina (KADOWAKI *et al.*, 1984).

A insulina é produzida em grande parte pelas células beta pancreáticas, que atravessam a barreira hematoencefálica; ela também pode ser produzida em algumas regiões do encéfalo, como hipocampo, córtex, pré-frontal, córtex entorrinal e bulbo olfatório (HOYER, 2003). O receptor de insulina (IR) também é encontrado em diversas áreas encefálicas, como bulbo, hipotálamo, córtex e hipocampo. (HENNEBERG; HOYER, 1995).

A injeção intracerebroventricular de STZ tem sido utilizada nas últimas décadas como uma forma de desregular o metabolismo encefálico da glicose, gerando um modelo de deficiência na sinalização de insulina e de resistência insulínica do encéfalo, o que pode ter uma relação com a doença de Alzheimer esporádica (DAE). (DE LA MONTE; WANDS, 2005). Em animais, esse modelo apresenta características similares às encontradas em humanos, incluindo perda de memória progressiva, deficiência no metabolismo da glicose encefálica, estresse oxidativo, aumento da fosforilação da proteína tau, aumento da proteína beta-amiloide e perda de neurônios, principalmente os colinérgicos (HYMAN *et al.*, 1986).

As pesquisas com STZ no Sistema Nervoso Central são relativamente novas, e ainda não se sabe muito sobre a forma de ação da droga: sabe-se que, uma vez dentro da célula, a STZ provoca liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SZKUDELSKI, 2001), as quais, por sua vez, podem ser a causa de processos fisiopatológicos que expliquem seu mecanismo de ação.

No primeiro processo fisiopatológico, podemos supor que a injeção de STZ atinja as células do hipocampo que são mais suscetíveis aos danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), tendo suas funções prejudicadas. É observado que, a partir do primeiro dia de injeção de STZ, neurônios nesta região se degeneram, além disso, esse processo pode persistir por períodos mais longos, perdurando por até quinze dias (YAMAMOTO *et al.*, 2007). Apesar disso, são observados também neurônios em

degeneração em regiões como hipotálamo e área septal, o que pode ser explicado pela presença de GLUT 2 nessas estruturas. (ARLUISON *et al.*, 2004).

Em um segundo processo fisiopatológico, que é mais persistente e que ocorre em outras regiões encefálicas, onde a morte neuronal ocorre de forma mais discreta, as EROs podem provocar efeitos na cascata de sinalização intracelular de insulina, podendo levar à formação de placas beta-amiloides e emaranhados neurofibrilares de tau fosforilada. A produção de EROs facilita a sinalização de uma resposta dependente de fosforilação de tirosina (MENG *et al.*, 2004). A permanência nesse estado facilitado pode levar, após algum período, à inibição da própria via de sinalização da insulina. Heide e colaboradores (2006) observaram que o estímulo excessivo ao receptor de insulina provoca decréscimo na sensibilidade das vias metabólicas intrínsecas, provocando uma desregulação no metabolismo celular.

Já é sabido que a injeção intracerebroventricular de STZ causa redução crônica (10-30%) no metabolismo da glicose e o glicogênio no córtex cerebral e o hipocampo (PLASCHKE; HOYER, 1993). Esses efeitos são associados a um progressivo déficit no aprendizado, na memória e no balanço energético cerebral. (DUELLI *et al.*, 1994).

A Doença de Alzheimer Esporádica é associada a dificuldades na aprendizagem e na memória (AGRAWAL *et al.*, 2011). Por essa razão, com o intuito de observar o déficit na memória causado pelo modelo através da injeção de STZ, realizamos testes que avaliaram memória de trabalho, memória espacial e memória episódica.

O teste do labirinto em Y é um teste utilizado na avaliação da memória de trabalho dos animais. A memória de trabalho corresponderia a uma determinada extensão da memória imediata. Essa extensão compreende um grupo de capacidades da memória temporária que operam em paralelo, ativadas segundo o tipo de estímulo, e que mantêm, durante segundos ou minutos, a informação que está sendo processada naquele momento. A memória de trabalho propicia que o gerenciador central de informações (executivo central) determine a relevância e originalidade de cada novo estímulo para o Sistema Nervoso num acesso rápido às memórias preexistentes (BADDELEY, 1997). Observando o número de alterações espontâneas corretas realizadas pelo animal. (PLASCHKE; HOYER, 1993). Além disso, também podemos avaliar a capacidade motora do animal através do gráfico do número de entradas. De acordo com Katelin e colaboradores (2010), foi observado um déficit significativo na memória de trabalho dos animais, resultado que também foi observado no

nosso modelo quando avaliamos o gráfico do número de alterações espontâneas, confirmando a influência do STZ na capacidade cognitiva do animal.

Segundo Belzung e Griebel (2001) e Hoyer (2004), os animais que receberam STZ intracerebroventricular não apresentaram deficiência motora, mostrando que o modelo não induz déficit motor. Esse resultado foi observado ao se avaliar o número de entradas do teste do labirinto em Y, no qual não houve diferença significativa entre os grupos CSF e STZ, corroborando, assim, com evidências, que não há déficit motor no modelo de indução com STZ.

O teste do labirinto aquático de Morris avalia a memória espacial dos animais através dos critérios de latência, isto é, o tempo que o animal demora a encontrar a plataforma, e o tempo no quadrante da plataforma, ou seja, o tempo em que o animal permanece no quadrante da plataforma durante o período do teste (Figura 13). (HOYER, 2004).

Segundo Chen e colaboradores (2013), Agrawal e colaboradores (2011), os quais utilizaram camundongos da linhagem 3xTg, e Hoyer (2004), nos animais que receberam STZ intracerebroventricular, foi observado um déficit significativo na memória espacial, quando avaliados os critérios de latência, o tempo no quadrante e o aprendizado. Nos nossos resultados, também verificamos déficit na memória espacial dos animais do grupo STZ em relação ao grupo CSF, quando avaliamos a latência e o tempo no quadrante.

Para a avaliação da memória episódica, foi utilizado o teste do reconhecimento de objeto, através do qual é possível observar o índice de preferência e o índice de reconhecimento dos animais em relação aos novos objetos colocados na arena (WANG *et al.*, 2011). Corroborando os resultados de Agrawal (2009) e Wang (2011), nos quais foram observados déficits significativos na avaliação da memória episódica a partir do teste do reconhecimento de objeto, nossos resultados também mostram uma diferença significativa entre os grupos, em ambos os critérios.

Dessa forma, nos testes realizados, observamos que houve uma significativa diferença entre os grupos, fornecendo déficit na memória dos animais e mostrando a eficácia da injeção de STZ intracerebroventricular como modelo de DAE. (WANG *et al.*, 2011a).

Assim como o modelo de indução de DAE através do peptídeo beta-amiloide, um dos modelos mais utilizados, que mostra alterações cognitivas induzidas dezesseis dias após uma única injeção intracerebroventricular dos peptídeos A β 1-40 ou A β 25-35 em camundongos, nos testes de labirinto aquático, labirinto em Y e reconhecimento de objeto

(BUTTERFIELD; POCERNICH, 2003), o modelo de indução de DAE através do STZ corrobora esses resultados, bem como também se mostra eficiente em fornecer déficits cognitivos importantes e característicos da doença de Alzheimer, podendo ser um modelo amplamente utilizado.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que:

- houve um déficit significativo na memória de trabalho;
- não houve déficit na atividade locomotora dos animais;
- foi observado déficit significativo na memória episódica;
- houve déficit significativo na memória espacial.

Portanto, a injeção de STZ mostrou ser um modelo eficaz, mimetizando os déficits de memória observados na demência de Alzheimer esporádica (DAE), podendo, assim, ser amplamente utilizado para testes de drogas neuroprotetoras com o intuito de impedir a progressão da DAE.

REFERÊNCIAS

- ALIEV, G. *et al.* Oxidative stress induced mitochondrial DNA deletion as a hallmark for the drug development in the context of the cerebrovascular diseases. **Recent. Pat. Cardiovasc. Drug. Discov.**, v. 6, p. 222-241, 2011.
- ALIEV, G. *et al.* Link between Cancer and Alzheimer Disease via Oxidative Stress Induced by Nitric Oxide: Dependent Mitochondrial DNA Over proliferation and Deletion. **Oxid. Med. Cell. Longev.** doi: 10.1155/962984, 2013.
- APRAHAMIAN, I.; MARTINELLI, J. E.; YASSUDA, M. S. Alzheimer's disease: an epidemiology and diagnosis review. **Rev. Bras. Clin. Med.**, v. 7, p. 27-35, 2009.
- ARLUISON, M. *et al.* Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT 2) an the adult rat brain: an immunohistochemical study. **J. Ch. Neuroanatomy**, v. 28, p. 117-136, 2004.
- ARULMOZHI, D. K.; VEERANJANEYULU, A.; BODHANKAR, S. I. Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: A glance. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, p. 217-221, 2004.
- BADDELEY, A. D. **Human memory: theory and practice**. 2a. ed. rev. Hove: Psychology Press, 1997.
- BAYDAS, G. *et al.* Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 35, p. 797-804, 2003.
- BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 368, p. 387-403, 2006.
- BUTTERFIELD, D. A. *et al.* Roles of amyloid β -peptide associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 43, p. 658-677, 2007.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 29, p. 222-230, 2000.
- DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. **Trands. Mol. Med.**, v. 13, p. 54-63, 2005.
- _____. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction an the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. **J. Alzheimer. Dis.**, v. 7, p. 45-61, 2005.
- FROTA, N. A. F. *et al.* Criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. **Dement. Neuropsychol.**, v. 5, n.3, p. 146-152, 2011.

- GAMELLO, T.; ANDRADE, R. B; CASTRO, A. L. **Estresse oxidativo como fator importante na fisiopatologia da doença de Alzheimer**. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- GELLA, A.; DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Adh. Migr.**, v. 3, p. 88-93, 2009.
- GENG, G.; LUO, H. M. The research progress of metals correlated to Alzheimer's disease. **Yao XueXueBao**, 2014.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R.; GARCÍA-BARRERA, T.; GÓMEZ-ARIZA, J. L. Metabolite profiling for the identification of altered metabolic pathways in Alzheimer's disease. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 2014.
- GRUNBLATT, E. *et al.* Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. **J Neurochem.**, v. 3, p. 757-770, 2007.
- HAASS, C.; SELKOE, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. **Nature**, v 8, p. 101-112, 2007.
- HALLIWELL, B. Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal*, v. 8, p. 2007-2019, 2006a.
- _____. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant. Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006b.
- HAN, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain' dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. **Biochem. J.**, v. 353, p. 411-416, 2001.
- HAUPTMANN, S. *et al.* Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. **Exp. Gerontol.**, v. 41, p. 668- 673, 2006.
- HEGER, N. E. Predictive testing and Alzheimer disease. **Clin. Chem.**, p. 1585-6, 2014.
- HEIDE, L. P. *et al.* Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. **Progress in Neurobiology**, v. 79, p. 205-221, 2006.
- HENNEBERG, N.; HOYER, S. Desensitization of the neuronal insulin receptor: a new approach in the etiopathogenesis of late-onset sporadic dementia of the Alzheimer type (SDAT)? **Arch. Gerontol. Geriatr.**, v. 21, p. 63-74, 1995.
- HOYER, S. Memory function and brain glucose metabolism. **Pharmacopsychiatry.**, 36 Suppl 1, s62-7, 2003.
- HYMAN, B. T. *et al.* Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. **Ann. Neurol.**, v. 20, p. 472-481, 1986.

ISHRAT, T. *et al.* Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Behav. Brain. Res.**, v. 171, p. 9-16, 2006.

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

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

LOVESTONE, S. Can we afford to the develop treatments for dementia? **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, v. 72, p. 685, 2002.

KADOWAKI, T. *et al.* Decreased autophosphorylation of the insulin receptor-kinase in streptozotocin diabetic rats. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 14208-14216, 1984.

KAR, S. *et al.* Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. **J. Psychiatry. Neurosci.**, v. 29, p. 427-41, 2004.

KARRAN, E.; MERCKEN, M.; DE STROOPER, B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 10, p. 698-712, 2011.

MARTHA, L. *et al.* Risk factors and preventive interventions for Alzheimer Disease: state of the science. **Arch. Neurol.**, v. 68, p. 1185-1190, 2011.

MENG, T. C. *et al.* Regulation of insulin signaling through Reversible Oxidation of the Protein-tyrosin Phosphatases TC45 and PTP1B. **J. Biol. Ch.**, v. 279, p. 37716-37725, 2004.

MENCHOLA, M.; WEISS, B.D. Addressing Alzheimer's: a pragmatic approach. **J. Fam. Pract.**, 2015.

MICHAEL, T.; LIN, M.; FLINT, B. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, p. 787- 795, 2006.

MICHAŁOWSKA-WENDER, G. *et al.* On the lack of a clear-cut association between alpha-2-macroglobulin deletion and the risk of Alzheimer disease in Poland. **Folia. Neuropathol.**, 2014.

MORRIS, R. Developments of water-maze procedure for studying spacial learning in the rat. **J. Neurosci. Methods.**, v. 2, p. 47-60, 1984.

POTTER, H. Kinesin light chain-1 variant E disrupts axonal transport and A β generation in Alzheimer's disease. **Bioessays.**, 2015.

PUGLIELLI, L.; TANZI, R. E.; KOVACS, D. M. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. **Nature Neurosci.**, v. 4, p. 345-351, 2003.

- RODRIGUES, L. **Alterações neuroglicais em hipocampo de ratos expostos a estreptozotocina intracerebroventricular**: Estratégias de Neuroproteção. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- ROZENTHAL, M.; ENGELHARDT, E.; LAKS, J. Memória: aspectos funcionais. **Rev. Bras. Neurol.**, v. 31, n. 3, p. 157-60, 1995.
- SALKOVIC-PETRISIC, M. *et al.* Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signaling pathway. **J. Neurochem.**, v. 96, p. 1005-1015, 2006.
- SCHAEFFER, E. L.; FIGUEIRÓ, M.; GATTAZ, W. F. Insights into Alzheimer's disease: pathogenesis from studies in transgenic animal models. **Clinics**, v. 66, p. 45-54, 2011.
- SELKOE, D. J. Alzheimer's Disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol. Review.**, v. 81, p. 741-766, 2001.
- SHU, Y.; CHECLER, F. Amyloid precursor protein, presenilins, and β -synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological application in Alzheimer's Disease. **Pharmacol. Rev.**, v. 54, p. 469-525, 2002.
- SWAROSWSKY, A. *et al.* Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. **Behav. Brain. Res.**, v. 190, p. 206-211, 2008.
- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in beta cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, p. 537-46, 2001.
- VICENTE, E. *et al.* S100B levels in the cerebrospinal fluid of rats are sex and anaesthetic dependent. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 34, p. 1126-1130, 2007.
- VILA, M.; RAMONET, D.; PERIER, C. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues. **J. Neurochem.**, v. 107, p. 317-328, 2008.
- WILSON, G. L.; LEITER, E. H. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. **Curr. Top. Microb. Immunol.**, v. 156, p. 27-33, 1990.
- WIMO, A.; JONSSON, L.; WINBLAD, B. An estimative of the total worldwide societal costs of dementia in 2005. **Alzheimer's & Dementia**, v. 3, p. 81-91, 2007.
- XIAN-HUI, D. *et al.* Age-related changes of brain iron load changes in the frontal cortex in APP^{swe}/PS1 Δ E9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J. Trace. Elem. Med. Biol.**, 2014.
- YAMAMOTO, S. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 958-967, 2007.
- ZHANG, L.; LI, Z. Alzheimer and the discovery of Alzheimer's disease. **Zhonghua Yi Shi Za Zhi**, 2014.