



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JÉSSICA RABELO BEZERRA

O α -BISABOLOL PROTEGE CAMUNDONGOS DA PERDA NEURONAL E DÉFICITS COGNITIVOS EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

FORTALEZA

2019

JÉSSICA RABELO BEZERRA

O α -BISABOLOL PROTEGE CAMUNDONGOS DA PERDA NEURONAL E DÉFICITS
COGNITIVOS EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA
INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Geanne Matos de Andrade.

FORTALEZA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B469a Bezerra, Jéssica Rabelo.
O alfa-bisabolol protege camundongos da perda neuronal e déficits cognitivos em modelo animal de Doença de Alzheimer Esporádica induzido por estreptozotocina / Jéssica Rabelo Bezerra. – 2019.
111 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.
1. Doença de Alzheimer Esporádica. 2. Estreptozotocina. 3. alfa-bisabolol. 4. Memória. 5. Neuroproteção.
I. Título.

CDD 615.1

JÉSSICA RABELO BEZERRA

O α -BISABOLOL PROTEGE CAMUNDONGOS DA PERDA NEURONAL E DÉFICITS COGNITIVOS EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Geanne Matos de Andrade.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais e minhas irmãs

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por estarem sempre presentes na minha vida, sendo um exemplo de ética, determinação e humildade. Agradeço pelo tempo, amor, compreensão e esforços dedicados a minha formação pessoal e profissional, e por sempre me apoiarem na busca dos meus sonhos.

As minhas irmãs, por todo amor, carinho e amizade. À Manu pelo amor, companheirismo e compreensão.

Aos meus amigos, pelos bons e maus momentos compartilhados, por trazerem leveza para minha vida.

À Profa Dra. Geanne Matos de Andrade, que me orientou neste trabalho, pela paciência, confiança, dedicação e competência na realização desse projeto. Por ter contribuído para a minha formação científica e pela oportunidade dos ensinamentos que serão importantes para a construção da minha trajetória profissional.

À Dra. Marta Regina Santos do Carmo, que me coorientou neste trabalho, e foi essencial para essa pesquisa. Agradeço pela paciência, ensinamentos, os quais foram vários, desde a estatística à conselhos sobre a vida, por sair várias vezes tarde do laboratório enquanto me ajudava. Uma pessoa por quem tenho profundo respeito e admiração, este trabalho não estaria finalizado sem a sua ajuda. Tenho certeza de que você é uma inspiração para muitos neste laboratório, um exemplo de sabedoria e humildade, sempre ajudando e ensinando a todos sem discriminação.

Ao Nuno, pela paciência e por toda a ajuda com o programa Any-maze para os testes de comportamento, na revelação das membranas do Western blot e nas quantificações.

Ao Prof. Dr. Carlos Campos, a Dra. Julliana Catharina de Sousa Neves e a Dra. Kelly Rose Tavares Neves por aceitarem participar da minha banca de Exame de Qualificação e por ajudarem a melhorar a qualidade deste trabalho com todas as sugestões.

A Profa Dra. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista e a Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra por aceitarem participar da minha banca de Defesa de Mestrado.

Aos outros colegas do Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC): Tyciane essa pessoa incrível que sempre preza pela justiça, que me ajudou imensamente desde o início deste trabalho, se dispondo muitas vezes a passar o dia inteiro no laboratório e nos muitos finais de semana que tiveram, agradeço por todo companheirismo e dedicação; a Priscila que também me ajudou imensamente tanto na parte prática quanto na concepção teórica desse estudo; a Amanda que muitas vezes é a alegria do laboratório e nos empolga

sempre com sua presença, obrigada por toda a ajuda; ao Albert pela paciência e por se disponibilizar em contribuir um pouco com este trabalho, pelas risadas e por sua presença marcante; ao Arnaldo, Kelly e Thais por sempre estarem presentes e se disporem a tirar nossas dúvidas; aos demais colegas de laboratório que sempre me ajudaram quando possível, seja nos experimentos ou tornando o ambiente do laboratório mais divertido: Juliete, Alfaete, Romana, Rayssa, Maiara, Isabelle, Victor.

Aos funcionários do Biotério do Núcleo de Pesquisa de Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Diego Abreu e Francisco Francismar pelo excelente trabalho, por toda atenção, simpatia e ajuda, o trabalho de vocês é essencial para todos os trabalhos realizados no Biotério e essa importância deve ser reconhecida por todos. Ao veterinário do biotério Wesley Lyeverton pelas contribuições nessa jornada de trabalho com animais.

Meu agradecimento em especial aos camundongos utilizados para a execução deste estudo, e que contribuíram com suas vidas para a realização deste trabalho. Sem eles este trabalho não seria possível de ser realizado.

As agências financiadoras CAPES, CNPq por terem colaborado financeiramente para a realização dessa pesquisa.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o engrandecimento deste trabalho.

A todos, minha humilde e sincera gratidão.

"A arte e nada mais que a arte!
Ela é a grande possibilitadora da vida,
a grande aliciadora da vida, o grande estimulante da vida".

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

O α -BISABOLOL PROTEGE CAMUNDONGOS DA PERDA NEURONAL E DEFICITIS COGNITIVOS EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER ESPORÁDICA INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela formação de placas amiloides e de emaranhados neurofibrilares intracelulares em áreas corticais, levando à perda progressiva de memória e comprometimentos cognitivos, sendo a forma mais comum de demência. Injeções intracerebroventriculares (icv) de estreptozotocina (STZ) têm sido utilizadas como modelo experimental da DA em roedores por causar prejuízos na sinalização cerebral da insulina, estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunções na neurogênese, os quais resultam em declínio cognitivo e são características da DA esporádica (DAE). O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos do α -bisabolol, um sesquiterpeno, que possui atividade anti-inflamatória, antioxidante e anti-apoptótica já descritas, sobre déficits cognitivos e dano neuronal em camundongos submetidos ao modelo experimental da DAE induzida pelas injeções de STZ. Camundongos Swiss machos (25-35 g) receberam injeções de STZ (3 mg/kg, icv, 1,5 μ l) bilateralmente, no dia 1 e 3 do experimento. O tratamento com α -bisabolol (50, 100 ou 200 mg/kg, v. o.) ou veículo (Tween 3% + salina, v. o.) foi realizado por 16 dias, iniciando 2 h após o segundo procedimento de indução. Foi feita a medição da glicemia dos animais antes e após a indução da DAE. Os resultados demonstraram que não houve alteração significativa na glicemia. O tratamento com o α -bisabolol melhorou de forma significativa os déficits na memória de trabalho, na memória aversiva, na memória de reconhecimento e na memória espacial, e não alterou a atividade locomotora. O tratamento com o α -bisabolol não foi capaz de diminuir o aumento da concentração de nitrito no córtex pré-frontal e hipocampo, mas foi capaz de diminuir significativamente o aumento da concentração de MDA no córtex pré-frontal diminuindo em 55% na dose de 100 mg/kg e em 53,24% na dose de 200mg/kg. O α -bisabolol preveniu o dano neuronal e a redução da expressão de sinaptofisina no hipocampo, aumentando a expressão de sinaptofisina em 57,21% e 68,32%, nas doses de 100 mg/kg e 200mg/kg, respectivamente. Esses resultados sugerem que a atividade neuroprotetora do α -bisabolol está relacionada à atividade anti-oxidante e a proteção sináptica, ressaltando seu potencial terapêutico ou adjuvante para o tratamento da DAE.

Palavras chave: Doença de Alzheimer Esporádica. Estreptozotocina. α -bisabolol. Memória. Neuroproteção.

ABSTRACT

α -BISABOLOL PROTECT MICE OF NEURONAL LOSS AND COGNITIVE DEFICITIS IN SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE ANIMAL MODEL INDUCED BY STREPTOZOTOCIN

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by the formation of amyloid and intracellular neurofibrillary plaques in cortical areas, leading to progressive memory loss and cognitive impairment, being a more common form of dementia. Intracerebroventricular (icv) injections of streptozotocin (STZ) has been used as an experimental model of sporadic AD in rodents because they cause impairment in insulin signaling, oxidative stress, neuroinflammation and neurogenesis dysfunctions, which result in cognitive and are characteristic of sporadic AD (SAD). The main purpose of this study was to study the effects of α -bisabolol, a sesquiterpene, which has anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-apoptotic activity already described, on neuronal damage and cognitive deficits in mice submitted to the experimental model of ADS induced by STZ. Male Swiss mice (25-35 g) received injections of STZ (3 mg/kg, icv) bilaterally on day 1 and 3 of the experiment. Treatment with α -bisabolol (50, 100 and 200 mg/kg, orally) or vehicle (Tween 3% + saline) was performed for 16 days, starting 2 h after the second induction procedure. Blood was collected for glucose analysis, before and after induction of SAD. The results showed that there was no significant change in blood glucose levels. Treatment with α -bisabolol significantly improved working memory, aversive memory, recognition memory and spatial memory, and don't change the locomotors activity. The α -bisabolol was not able to decrease nitrite concentration in the prefrontal cortex and hippocampus but was able to decrease the MDA increase concentration in the prefrontal cortex decreasing by 55% at the dose of 100 mg/kg and in 53.24% at the dose of 200mg/kg. The α -bisabolol (100 and 200 mg/kg) also increased cell viability and increased synaptophysin expression, 57,21 % and 68,32 % respectively, in the hippocampus. These results suggest that the neuroprotective activity of α -bisabolol is related to anti-oxidant activity and synaptic protection, highlighting its therapeutic or adjuvant potential for the treatment of SAD.

Keywords: Alzheimer disease sporadic. Streptozotocin. α -bisabolol. Memory. Neuroprotection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1- | Disfunção mitocondrial na DA..... | 10 |
| Figura 2- | Esquema do Metabolismo da APP..... | 15 |
| Figura 3- | Fórmula molecular da estreptozotocina..... | 21 |
| Figura 4 - | Provável mecanismo de neurotoxicidade induzida pela STZ e a patologia DA..... | 22 |
| Figura 5 - | Estrutura molecular do α -bisabolol..... | 24 |
| Figura 6 - | Esquema das seções de micro-injeções..... | 30 |
| Figura 7 - | Desenho experimental mostrando a sequência dos testes comportamentais realizados nos subgrupos de animais..... | 32 |
| Figura 8 - | Arena do Campo Aberto..... | 33 |
| Figura 9 - | Labirinto em Y..... | 34 |
| Figura 10- | Ilustração representando a metodologia do teste de reconhecimento de objetos..... | 35 |
| Figura 11- | Aparelho de Esquiva Passiva..... | 36 |
| Figura 12- | Labirinto aquático com pistas..... | 37 |
| Figura 13- | Sistema de <i>Western blotting</i> montado..... | 42 |
| Figura 14- | Efeito do tratamento com o α -bisabolol sobre a glicemia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por STZ..... | 45 |
| Figura 15- | Efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) na atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ no teste do campo aberto..... | 47 |
| Figura 16- | Efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a memória de trabalho em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ... | 48 |
| Figura 17- | Efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a memória de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 49 |
| Figura 18- | Efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a memória aversiva recente e tardia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 50 |
| Figura 19- | Efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a memória espacial em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 52 |
| Figura 20- | Efeitos do α -bisabolol sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 53 |
| Figura 21- | Efeitos do α -bisabolol sobre a peroxidação lipídica (TBARS) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 54 |
| Figura 22- | Fotomicrografias (Violeta de Cresil), aumento 20x, representativas do efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a viabilidade celular no córtex pré-frontal de camundongos após as injeções de STZ..... | 56 |
| Figura 23- | Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no córtex pré-frontal de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 57 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 24- | Fotomicrografias (Violeta de Cresil), aumento 200x, representativas do efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a viabilidade celular no hipocampo de camundongos após as injeções de STZ..... | 58 |
| Figura 25- | Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o cresil violeta no hipocampo na região CA1 de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 59 |
| Figura 26- | Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no hipocampo na região CA3 de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 59 |
| Figura 27- | Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no hipocampo na região do Giro Denteado (GD) de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 60 |
| Figura 28- | Fotomicrografias (coloração por Fluoro Jade C), aumento 200x, representativas do efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a degeneração neuronal no córtex pré-frontal de camundongos após as injeções de STZ..... | 62 |
| Figura 29- | Avaliação da degeneração neuronal através da coloração com o Fluoro Jade C no córtex pré-frontal de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 63 |
| Figura 30- | Fotomicrografias (coloração por Fluoro Jade C), aumento 200x, representativas do efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a degeneração neuronal no hipocampo de camundongos após as injeções de STZ..... | 64 |
| Figura 31- | Avaliação da degeneração neuronal através da coloração com o Fluoro Jade C no hipocampo na região CA1 de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 65 |
| Figura 32- | Avaliação da degeneração neuronal através da coloração com o Fluoro Jade C no hipocampo na região CA3 de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 65 |
| Figura 33- | Avaliação da degeneração neuronal através da coloração com o Fluoro Jade C no hipocampo na região GD de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 66 |
| Figura 34- | Avaliação da formação de placas senis através da coloração com Tioflavina S, aumento 200x, no córtex pré-frontal de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 67 |
| Figura 35- | Avaliação da formação de placas senis através da coloração com Tioflavina S, aumento 200x, no hipocampo de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 68 |
| Figura 36- | Expressão de sinaptofisina avaliada por <i>Western blotting</i> no córtex pré-frontal de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 69 |
| Figura 37- | Expressão de sinaptofisina avaliada por <i>Western blotting</i> no hipocampo de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ..... | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | | | |
|----------|---|---|----|
| Tabela 1 | - | Sítios das micro-injeções bilaterais de STZ nos ventrículos laterais..... | 30 |
| Tabela 2 | - | Protocolo experimental..... | 32 |
| Tabela 3 | - | Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos antes e após os procedimentos de indução..... | 45 |
| Tabela 4 | - | O efeito do tratamento com o α -bisabolol (50, 100 e 200 mg/kg v.o.) na distância percorrida, velocidade média e no número de crossings e rearings em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ no teste do campo aberto..... | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|-----------|---|--|
| 4HNE | - | 4-hidroxi-2-trans-nonenal |
| AchE | - | Acetilcolinesterase |
| aCSF | - | artificial Fluido Cérebro Espinal |
| ADI | - | <i>Alzheimer's Disease International</i> |
| ANOVA | - | <i>Analysys of Variance</i> (Análise de Variância) |
| ApoE | - | Apolipoproteína E |
| APP | - | Proteína Precursora Amiloide |
| ATP | - | Adenosina trifosfato |
| A β | - | Peptídeo beta amilóide |
| BHE | - | Barreira Hematoencefálica |
| CA1 | - | Corno de Amon 1 |
| CA3 | - | Corno de Amon 3 |
| CDR | - | <i>Clinical Dementia Rating</i> |
| DA | - | Doença de Alzheimer |
| DAE | - | Doença de Alzheimer Esporádica |
| DAF | - | Doença de Alzheimer Familiar |
| DM | - | Diabetes mellitus |
| DNA | - | Ácido desoxirribonucleico |
| ENF | - | Emaranhados Neurofibrilares |
| EROS | - | espécies reativas de oxigênio resultante |
| GAD | - | <i>Glutamic Acid Decarboxylase</i> |
| GD | - | Giro Denteado |
| GLUT | - | Transportadores de glicose independentes de sódio |
| GSK3 | - | Enzima Glicogênio Sintase Cinase 3 |
| i.p. | - | Injeção Intraperitoneal |
| icv | - | Intracerebroventricular |
| IDE | - | Enzima de degradação da insulina |

| | |
|----------------|---|
| IGF | - Fatores de crescimento semelhantes à insulina |
| LDL | - Lipoproteína de Baixa Densidade |
| LTD | - Depressão de longa duração |
| LTP | - Potenciação de longa duração |
| MCD | - Memória de curta duração |
| MLD | - Memória de longa duração |
| MMSE | - <i>Mini-Mental State Examination</i> |
| MO | - Memória Operacional |
| NEP | - Nefrilisina |
| NO | - Óxido nítrico |
| O ₂ | - oxigênio molecular |
| P13K | - Enzima fosfatidilinositol-3 cinase |
| PKB | - Proteína cinase B |
| PS1 | - Presenilinas 1 |
| PS2 | - Presenilinas 2 |
| RI | - Receptor de insulina |
| sAPP α | Proteína precursora de α -amiloide secretada |
| SGLT | - Transportadores de glicose dependentes de sódio |
| SNC | - Sistema Nervoso Central |
| SOD | - Superóxido dismutase |
| SRI | - Substrato do Receptor de Insulina |
| STZ | - Estreptozotocina |
| TAU | - proteína TAU |
| v.o. | - via oral |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 3 |
| 1. 1 A Doença de Alzheimer | 3 |
| 1. 1. 1 Epidemiologia..... | 3 |
| 1. 1. 2 Classificação | 4 |
| 1. 1. 3 Sintomas da DA | 5 |
| 1. 1. 4 Fatores de Risco | 6 |
| 1. 1. 5 Fisiopatologia..... | 6 |
| 1. 2 Estresse Oxidativo na DA..... | 8 |
| 1. 3 Memória na DA | 11 |
| 1. 4 Hipóteses sobre a etiopatologia da DA..... | 14 |
| 1. 4. 1 Cascata Amiloide..... | 14 |
| 1. 4. 2 Diabetes tipo 3 | 15 |
| 1. 5 Metabolismo da Glicose | 16 |
| 1. 6 Diagnóstico e tratamento da DA | 17 |
| 1. 7 Modelos de DAE em animais..... | 19 |
| 1. 8 Modelo Animal de DAE Induzida por STZ..... | 20 |
| 1. 9 Terpenos e neuroproteção..... | 23 |
| 1. 10 α -Bisabolol | 24 |
| 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA | 27 |
| 3 OBJETIVOS | 28 |
| 3. 1 Objetivo Geral..... | 28 |
| 3. 2 Objetivos Específicos..... | 28 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 4. 1 Animais | 29 |
| 4. 2 Drogas | 29 |
| 4. 3 Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por Estreptozotocina (STZ) | 29 |
| 4. 4 Protocolo Experimental..... | 31 |
| 4. 5 Dosagem da glicemia | 32 |
| 4. 6 Testes comportamentais | 33 |
| 4. 6. 1 Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto..... | 33 |
| 4. 6. 2 Avaliação sobre a Memória | 34 |
| 4. 6. 2. 1 Avaliação da memória de trabalho - Teste Labirinto em Y (Y-maze)..... | 34 |
| 4. 6. 2. 2 Avaliação da memória de reconhecimento – Teste do Reconhecimento de Objetos | 35 |

| | |
|---|----|
| 4.6.2.3 Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva..... | 36 |
| 4.6.2.4 Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático | 37 |
| 4.7 Avaliação do Estresse Oxidativo..... | 38 |
| 4.7.1 Determinação da peroxidação lipídica | 38 |
| 4.7.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato | 38 |
| 4.8 Análise histopatológica | 39 |
| 4.8.1 Marcação de placas amiloides de A β – Tioflavina S | 39 |
| 4.8.2 Avaliação da viabilidade celular através do Violeta de Cresil..... | 40 |
| 4.8.3 Avaliação da degeneração neuronal através do Fluoro Jade C..... | 40 |
| 4.9 Avaliação da expressão de proteínas de sinapse, sinaptofisina através da técnica de Western-blot..... | 41 |
| 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 44 |
| 6 RESULTADOS | 45 |
| 6.1 Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 45 |
| 6.2 Efeitos do α -bisabolol sobre a atividade locomotora (Teste do Campo aberto) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 46 |
| 6.3 Efeitos do α -bisabolol sobre o déficit na memória de trabalho (Teste do Labirinto em Y) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ. | 48 |
| 6.4 Efeitos do α -bisabolol sobre o déficit na memória de reconhecimento (Teste de Reconhecimento de Objetos) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 48 |
| 6.5 Efeitos do α -bisabolol sobre a memória aversiva (Teste da Esquiva Passiva) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 49 |
| 6.6 Efeitos do α -bisabolol sobre o déficit na memória espacial (Teste do Labirinto Aquático) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ. | 50 |
| 6.7 Efeitos do α -bisabolol sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ. | 53 |
| 6.8 Efeitos do α -bisabolol sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 54 |
| 6.9 Efeitos do α -bisabolol sobre a integridade neuronal evidenciada através da coloração com o Cresil violeta no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ. | 55 |
| 6.10 Efeitos do α -bisabolol sobre a degeneração neuronal evidenciada através da coloração com Fluoro Jade C no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ..... | 61 |

| | |
|---|-----------|
| <i>6. 11 Efeitos do α-bisabolol sobre a formação de placas senis evidenciadas através da coloração com Tioflavina S no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ</i> | <i>67</i> |
| <i>6. 12 Avaliação da expressão de sinaptofisina através da técnica de Western-blot.....</i> | <i>69</i> |
| 7 DISCUSSÃO | 71 |
| 8 CONCLUSÃO | 87 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 88 |

1 INTRODUÇÃO

1. 1 A Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1907 (STELZMANN *et al.*, 1995). Ele estudou e publicou o caso da sua paciente Auguste Deter, uma mulher saudável que, aos 51 anos foi acometida de uma doença mental incomum, desenvolvendo um quadro de perda progressiva de memória e alterações de comportamento. Após o falecimento de sua paciente, aos 55 anos, ele observou que o seu tecido cerebral apresentava extensa perda de células e descreveu as alterações histológicas características da doença: placas senis e Emaranhados Neurofibrilares (ENF) que se tornaram os indicativos patológicos da DA (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010).

1. 1. 2 Epidemiologia

A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada por perda de memória e déficits cognitivos progressivos, afetando gravemente as atividades da vida diária (VILLEMAGNE *et al.*, 2017). Entre os idosos, é a forma mais comum de demência, compreendendo de 60 a 80% de todos os casos (WIRZ *et al.*, 2014). Sua prevalência aumenta com a idade, alcançando cerca de 1% no grupo etário de 60 a 64 anos e 24% a 33% naqueles com idade superior a 85 anos (APRAHAMIAN *et al.*, 2009; SCHAEFFER *et al.*, 2011).

O crescimento da expectativa de vida da população mundial tem resultado em um impacto significativo na saúde humana, resultando no aumento do número de indivíduos que alcançam a idade na qual as doenças neurodegenerativas tornam-se comuns (SELKOE, 2001; PAL; TYLER, 2016).

Por sua vez, os déficits nas funções cognitivas, incluindo a memória, são as observações mais comuns durante o envelhecimento (SHIVARAMA SHETTY; SAJIKUMAR, 2017), e associado a outras perturbações cognitivas podem caracterizar um estado de demência. 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 dos casos de demência, especialmente DA, entre a população acima de 60 anos em todo o mundo (LANGA *et al.*, 2017).

De acordo com a *Alzheimer's Disease International* (ADI), estima-se que mais de 48,6 milhões de pessoas foram afetadas pela DA no mundo e esse número dobra a cada 20 anos, onde são registrados 9,9 milhões de novos casos de demência a cada ano (ADI, 2015).

A previsão é que o número de doentes com Alzheimer chegue a 74,7 milhões em 2030 e a 131,5 milhões em 2050 (*World Health Organization*, 2013; PRINCE *et al.*, 2016).

No Brasil, projeções indicam que a prevalência média apresenta-se mais alta que a mundial, na população acima de 65 anos, passando de 7,6% para 7,9% entre 2010 e 2020, ou seja, 55.000 novos casos por ano (BURLÁ, 2013).

Com base nos dados epidemiológicos, a demência é amplamente reconhecida como um significativo problema médico, social e econômico nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (BREITNER *et al.*, 2009; ZILKENS *et al.*, 2009). O custo mundial da demência em 2015 foi estimado em US\$ 818 bilhões, e esse número continua a aumentar com o número de casos de demência, com a maioria dos custos relacionados aos cuidados familiares e sociais (LIVINGSTON *et al.*, 2017). Esse aumento da demência não é exclusivo dos países de alta renda; de fato, a maioria dos indivíduos com demência vive nos países de renda média ou baixa, onde o enfrentamento do envelhecimento da população se tornou um desafio social e econômico (FERRI; JACOB, 2017).

A ausência de tratamento dos sintomas comportamentais e psicológicos dos pacientes com DA está associada à Síndrome Burnout do cuidador, ocasionando sobrecarga, estresse, cansaço mental e depressão em quem cuida; e acarretando a institucionalização desses pacientes, a insuficiente gestão de suas comorbidades e os custos elevados dos cuidados de saúde (SCHNEIDER, *et al.*, 1999; CUIJPERS, 2005; GUTIERREZ, 2014).

1. 1. 3 Classificação

A DA pode se apresentar de duas maneiras, a Doença de Alzheimer Familiar – DAF, e a Doença de Alzheimer Esporádica – DAE. A DAF possui início precoce, ocorre geralmente antes dos 65 anos, e está relacionada com mutações em diversos genes, tais como o gene codificador APP, da PS1 e PS2 e da apolipoproteína E (ApoE) (SHU; CHECLER, 2002; FRIDMAN *et al.*, 2004; PHILIPSON *et al.*, 2010; XIE *et al.*, 2013), 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 DAE, que é responsável por aproximadamente 95% dos casos DA (MISHRA *et al.*, 2018), é a principal causa de demência em todo o mundo onde o maior fator de risco é o envelhecimento, no qual sintomas ocorrem a partir dos 65 anos de idade e não estão

relacionados às mutações observadas na DAF (XIE *et al.*, 2013; BEKRIS *et al.*, 2010; REITZ *et al.*, 2011).

1. 1. 4 Sintomas da DA

Os sintomas da DA resultam de múltiplos fatores etiológicos, incluindo fatores ambientais, genéticos e metabólicos, dentre esses, a redução do metabolismo de glicose e utilização de energia que são observados nos estágios iniciais da doença (CHEN *et al.*, 2013).

A DA é principalmente caracterizada pelo declínio progressivo da função cognitiva, resultando em perda progressiva de memória que envolve uma dificuldade em aprendizagem e na evocação de informações recentemente aprendidas (VILLEMAGNE *et al.*, 2017). Esse sintoma evolui insidiosamente e progride lentamente ao longo do tempo. Ocorre declínio de outras funções como a atenção, dificuldades na fala e nas atividades motoras, depressão, alucinações e alterações nos padrões de sono, afetando o funcionamento ocupacional e social (MEGA, 2002; KAR *et al.*, 2004; MCKHANN *et al.*, 2002; REITZ *et al.*, 2011).

As desordens na linguagem são frequentes e incluem dificuldades de identificação, fluência, compreensão e associação das palavras, podendo levar a afasia. Desorganização no controle motor (apraxia) também pode ser percebida, além do não reconhecimento de objetos e/ou familiares (agnosia) (HELMES; OSTBYE, 2002).

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).

Sintomas como um declínio progressivo em funções cognitivas e emocionais, mudanças comportamentais, déficits de julgamento e fluência verbal, aumentam em frequência e gravidade com a evolução da doença, que tem um grande impacto no ambiente familiar, devido à necessidade de cuidados contínuos ao paciente (CITRON, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2003; BLESA, 2004).

Ainda, sintomas comportamentais e psicológicos da DA incluem agitação, comportamento motor aberrante, ansiedade, depressão e alucinações. É estimado que estes sintomas acometem cerca de 90% dos pacientes com demência, os quais afetam

dramaticamente a qualidade de vida de pacientes com DA e seus cuidadores (CEREJEIRA *et al.*, 2012).

1. 1. 5 Fatores de Risco

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

Foram também apontados como fatores associados à DA a ocorrência de hiperlipidemia, hipertensão, parâmetros vasculares e metabólicos, e ainda o uso de tabaco (BIESSELS; KAPPELLE, 2005). É importante ressaltar que o tratamento desses fatores de risco vascular ou sua redução por mudanças no estilo de vida pode reduzir o risco de desenvolver DA (LIVINGSTON *et al.*, 2017).

Muitos estudos epidemiológicos têm fornecido evidências diretas de que o Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 é um forte fator de risco para DA (SATO *et al.*, 2011; TAKEDA *et al.*, 2011; OHARA *et al.*, 2011) e o estado de resistente à insulina tem sido reconhecido por desempenhar um papel importante na fisiopatologia da Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) (BOSCO *et al.*, 2011).

Dentre os fatores protetores, estão a dieta mediterrânea, a atividade física, a escolaridade, a ingestão de ácido fólico e o consumo moderado de álcool (MARTHA *et al.*, 2011). Essa interação entre esses fatores protetores e a DA ocorre por mecanismos moleculares ainda desconhecidos (SCARMEAS *et al.*, 2009; MARTHA *et al.*, 2011).

1. 1. 6 Fisiopatologia

A patologia da DA constitui um quadro complexo envolvendo a combinação de fatores genéticos, moleculares e ambientais. A neurodegeneração ocorre em múltiplas regiões do cérebro, predominantemente no hipocampo, córtex, amígdala, neocórtex, várias áreas subcorticais, rafe dorsal e *locus ceruleus* (KAR *et al.*, 2004; BLENNOW *et al.*, 2006; LIVINGSTON *et al.*, 2017).

Histopatologicamente, a DA caracteriza-se por uma extensa perda neuronal, com presença das chamadas placas senis que são formadas pelo depósito extracelular do peptídeo β -amiloide (A β), por emaranhados neurofibrilares intracelulares (ENF) no cérebro e níveis

elevados de A β (principalmente A β 40 e A β 42) (MARTHA *et al.*, 2011; SELKOE; HARDY, 2016; WIRZ *et al.*, 2014). Os ENF são formados a partir da degeneração do citoesqueleto neuronal decorrente da hiperfosforilação e deposição anormal da Proteína Tau, associada aos microtúbulos, e consequente perda neuronal com diminuição da massa encefálica (ALLARD *et al.*, 2012; IQBAL *et al.*, 2016; CALIGNON *et al.*, 2012). O desenvolvimento das placas senis começa primeiramente nas áreas cerebrais associadas à cognição, aumentando sua distribuição para outras áreas corticais com progressão da doença (SCHACHTER; DAVIS, 2000).

Estudos têm demonstrado que a neurotoxicidade é exercida não pelas placas senis ou amilóides localizadas extracelularmente, mas sim pelas formas oligoméricas fibrilares intracelulares do peptídeo A β , formadas no decurso da doença (GILBERT, 2013). O acúmulo intracelular dos oligômeros do peptídeo A β resulta em falha sináptica e dano neuronal em áreas corticais do cérebro essenciais para a memória e outros domínios cognitivos (VILLEMAGNE *et al.*, 2017). Acredita-se que essas mudanças contribuam para a neurodegeneração progressiva associada à DA (SPIRES; JONES; HYMAN, 2014).

A deposição de β A é específica para DA, mas o acúmulo da Proteína TAU também é observado em outras doenças neurodegenerativas, coletivamente referidas como Taupatias, que incluem doença de Pick, degeneração corticobasal e paralisia supranuclear progressiva (GIBBONS *et al.*, 2018).

Associado 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 a formação de memórias, como o córtex pré-frontal e o hipocampo, juntamente com suas regiões associadas, levando a uma atrofia nessas áreas por morte neuronal e declínio cognitivo (BLENNOW *et al.*, 2006; GENG; LUO, 2014). Os neurônios remanescentes passam por extensivas mudanças morfológicas, entre elas distrofia neurítica, remodelação das árvores axônicas e da densidade dos espinhos dendríticos (SPIRES; HYMAN, 2005).

Dessa forma, cria-se um quadro de desequilíbrio neuroquímico onde se tem sinais de neurodegeneração, neuroinflamação, estresse oxidativo, aumento da sinalização pró-apoptótica, déficit colinérgico, disfunção mitocondrial, com o prejuízo da transmissão sináptica e do equilíbrio entre diferentes neurotransmissores (BLENNOW *et al.*, 2006). Todas essas mudanças alteram a conectividade dos circuitos de memória e cognição, sendo responsável pelos sintomas existentes na DA (TERRY *et al.*, 1991).

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 Familiar (DAF) ou de início precoce (PUGLIELLI; TANZI; KOVACS, 2003).

1. 2 Estresse Oxidativo na DA

Conceitualmente, o estresse oxidativo refere-se ao estado em que a produção de agentes oxidantes ultrapassa a capacidade dos mecanismos antioxidantes, caracterizando-se como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade da célula de se defender contra eles (HALLIWELL, 2006b). Um aumento expressivo nas espécies reativas pode produzir o dano a lipídios, proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA), induzindo à necrose ou à apoptose (KUSHNAREVA; NEWMAYER, 2010).

De maneira geral, o encéfalo e os tecidos nervosos estão mais propensos aos danos oxidativos devido a fatores como o alto fluxo de cálcio pelos neurônios, a presença de neurotransmissores excitatórios, principalmente o glutamato, além da alta taxa de consumo de oxigênio molecular (O_2) pelos tecidos nervosos e o baixo nível de antioxidantes (HALLIWELL, 2006a; GARCIA, 2009).

Sabe-se que a disfunção mitocondrial com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) acompanha o envelhecimento (DAIBER *et al.*, 2015, WU *et al.*, 2015). Além disso, muitas evidências sugerem que as mitocôndrias têm um papel central em doenças neurodegenerativas, em razão de seu papel na regulação da morte celular (MICHAEL *et al.*, 2006). De fato, inúmeros estudos demonstraram a função mitocondrial como um fator importante envolvido na patogênese da DA, através da produção de EROS (SELFRIDGE *et al.*, 2013; ZHAO; ZHAO, 2013). Além disso, várias investigações demonstraram o aumento da oxidação de lipídios cerebrais e estresse nitrosativo no cérebro e no sangue de pessoas com DA (SULTANA *et al.*, 2013).

Além disso, estudos tem mostrado que o estresse oxidativo e nitrosativo (NOS) desempenham um papel prejudicial na patogênese da DA, levando ao dano de elementos celulares, como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (BUTTERFIELD *et al.*, 2010). O NOS resulta da acumulação de macromoléculas oxidadas/danificadas que não são removidas e renovadas eficientemente. Para combater a citotoxicidade das ERO's, as células são dotadas de uma variedade de mecanismos de defesa antioxidante, incluindo as enzimas protetoras, como catalase, superóxido dismutase (SOD), glutatona e glutatona peroxidase (GPx), assim como sequestradoras de radicais livres, como o ascorbato e a vitamina E (HOWES; HOUGHTON, 2012; LOIZZO *et al.*, 2009).

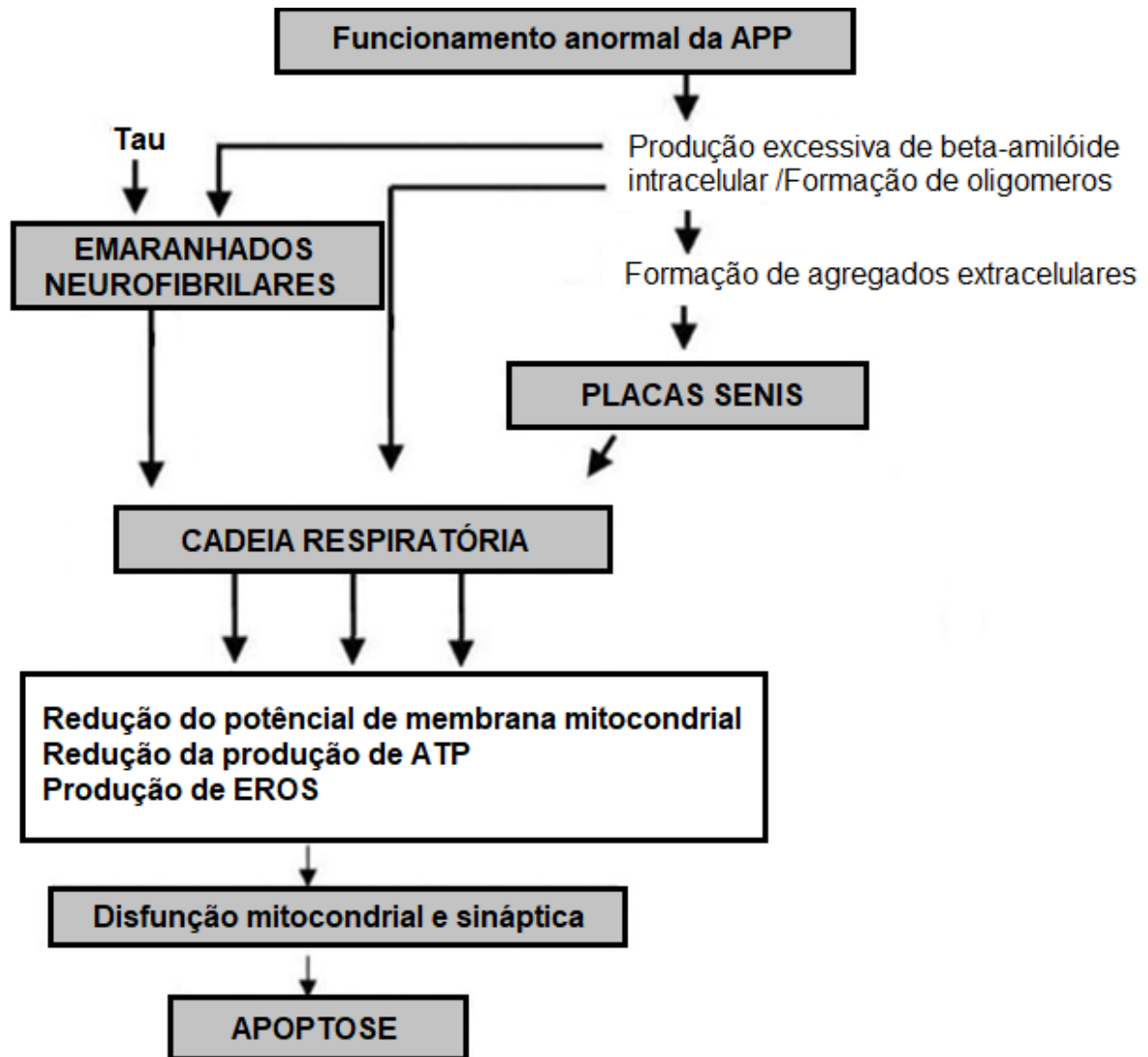
Uma redução ou a perda de função das enzimas antioxidantes, por diminuição da atividade específica, foi relatada na DA (KIM *et al.*, 2006). O crescimento de relatos clínicos e também experimentais sugere que o estresse oxidativo pode desempenhar um papel importante na degeneração neuronal, em doenças como a DA, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson e doença de Huntington e que tratamentos antioxidantes podem ser benéficos para doenças neurodegenerativas (ALIEV *et al.*, 2013; ZHAO; ZHAO, 2013).

O estresse oxidativo na DA, se manifesta através 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 *et al.*, 2009).

Na mitocôndria, o A β 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 (ALIEV *et al.*, 2013), que pode ser observado na Figura 1, adaptada de Gemelli e colaboradores (2013). O A β pode também causar neurotoxicidade por meio da produção direta destas espécies reativas, através da interação com Cu²⁺, Fe²⁺ e Zn²⁺ (FINEFROCK *et al.*, 2003; ALIEV *et al.*, 2011).

Presença do A β está fortemente relacionado ao dano oxidativo às membranas lipídicas, tornando-as mais hidrofílicas e alterando a função de transportadores, enzimas e receptores celulares localizados nessas membranas (XIE *et al.*, 2013). Em pacientes com DA, observou-se um aumento na produção 4-hidroxi-2-trans-nonenal (4HNE), um dos principais produtos da oxidação lipídica, ocasionando modificações oxidativas do transportador de glutamato GLT1 e, assim, contribuindo para a neurodegeneração. Além disso, sabe-se que o 4HNE se liga às proteínas glutationa-S-transferase e proteína 1, ocasionando redução da atividade das mesmas (PÉREZ; ARANCIBIA, 2007).

Figura 1 – Disfunção mitocondrial na DA.



Fonte: (GEMELLI, 2013).

APP: precursor da proteína amiloide, ERO: espécies reativas de oxigênio, ATP: adenosina trifosfato, TAU: proteína TAU

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 (XIE *et al.*, 2013). Em estudos prévios, foi demonstrado que, através da ação das EROs, os lipídios de membrana tiveram sua conformação alterada e participaram da formação de ENF em encéfalos de pacientes portadores de DA (ANSARI; SCHEFF, 2010; CHAUHAN; CHAUHAN, 2006; XIE *et al.*, 2013).

1. 3 Memória na DA

O hipocampo e o neocórtex são áreas do cérebro essenciais para o processo de formação de memória (DUDAI; MORRIS, 2013). Apesar da neurodegeneração progressiva ser uma das principais patologias da DA, a redução progressiva de sinapses e espinhas dendríticas em várias regiões do cérebro, associadas ao aprendizado e à memória, tais como o hipocampo e o neocórtex, é o que melhor se correlaciona com o declínio cognitivo progressivo presente na DA (POOLER; NOBLE; HANGER, 2014; SCHEFF *et al.*, 2006).

A redução na transmissão sináptica ocorre no estágio inicial da doença e estudos mostram que a morte neuronal no início não é suficientemente grande para explicar a perda sináptica. Isto sugere que, em pacientes com DA, existe uma disfunção sináptica que antecede a neurodegeneração (ARENDDT, 2009).

Sendo que esta disfunção sináptica não é caracterizada apenas pela redução do número de sinapses, mas também por uma atividade anormal de redes neurais que podem interferir nos mecanismos de aprendizagem e também podem levar a uma hiper-estimulação citotóxica que contribui com processos neurodegenerativos (PALOP; MUCKE, 2010; VERRET *et al.*, 2012). Estas observações mencionadas acima sugerem que a neurodegeneração presente na DA é precedida por uma disfunção na plasticidade sináptica seguida por uma redução no número de sinapses e a redução na plasticidade sináptica é o principal responsável pelo declínio cognitivo da doença (HUANG; MUCKE, 2015).

Os neurônios colinérgicos estão presentes em várias regiões do sistema nervoso e são responsáveis por modular atividades cognitivas relacionadas com memória e aprendizado. Além disso, desempenham um papel crítico no desenvolvimento cortical, no controle do fluxo sanguíneo no cérebro e no ciclo sono-vigília (SCHLIEBS; ARENDT, 2006).

A morte de neurônios colinérgicos é predominantemente encontrada em casos de envelhecimento patológico, como a DA, enquanto que o envelhecimento normal é acompanhado por uma perda gradual da função colinérgica causada por degeneração dendríticas, sináptica, e axonal. Na DAF e nos estágios avançados da DAE existe uma grave perda de inervações colinérgicas corticais, enquanto que em pacientes com comprometimento cognitivo leve, ou em estágios iniciais da DA, não existe neurodegeneração e sim uma perda da função colinérgica (SCHLIEBS; ARENDT, 2011).

Tendo em vista o importante papel que o sistema colinérgico desempenha nos processos funcionais que levam a DA, uma das estratégias de tratamento sintomático da DA

mais comum consistem em aumentar os níveis de acetilcolina na fenda sináptica reduzindo o seu metabolismo com inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (ANAND; GILL; MAHDI, 2014). A modulação direta dos receptores colinérgicos (muscarínicos ou nicotínico) também pode ser outra abordagem considerável no tratamento da DA. No hipocampo, a expressão dos receptores colinérgico estão presentes tanto em terminais pré-sinápticos quanto pós-sinápticos e quando eles são ativados existe um aumento na potencialização de longa duração (LTP) (DREVER; RIEDEL; PLATT, 2011)

Os tipos de memórias podem ser classificadas quanto ao seu tempo de retenção (ou duração) em: memórias de longa duração, memórias de curta duração e memórias de trabalho (*working memory*) (GOLD; McGAUGH, 1975), (LENT, 2001). A memória de trabalho ou operacional é muito breve e fugaz e serve para o armazenamento temporário (segundos ou poucos minutos) de informações que serão úteis apenas para o raciocínio imediato e resolução de problemas, podendo ser descartadas (esquecidas) logo a seguir (IZQUIERDO; MEDINA, 1991).

A memória de curta duração dura minutos ou horas e servem para proporcionar a continuidade do nosso sentido do presente. Essa memória em curto prazo engloba o tempo durante o qual a memória de eventos em curso está sendo consolidada e convertida à memória de longo prazo (DUDAI, 2004). Durante este tempo, a memória de curta duração é vulnerável e sujeita a desaparecer, ao passo que as memórias de longo prazo são extremamente resistentes e persistem na presença de grave lesão cerebral (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996).

O processo de consolidação que converte memórias de curto prazo em memórias de longo prazo envolve o hipocampo e as porções adjacentes entorrinal, perirrinal e parahipocampal do córtex temporal medial (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996) e consiste na alteração da atividade dos circuitos envolvidos através de plasticidade neural. Os mecanismos propostos para esse fenômeno que suportam a formação de memórias são a potenciação de longa duração (LTP, do inglês "*long-term potentiation*") e a depressão de longa duração (LTD, do inglês "*long-term depression*") (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993), (IZQUIERDO; McGAUGH, 2000).

As memórias de longa duração não são tão lábeis, mas precisam de um tempo maior para serem codificadas na rede neural, estimado por no mínimo 6 até 12 horas e podem ser divididas, quanto a sua natureza ou conteúdo, em memórias explícitas ou declarativas e memórias implícitas ou não-declarativas. A memória declarativa está relacionada a experiências próprias, reconhecimento de cenas e de objetos familiares. Esse tipo de memória

envolve a recuperação consciente de eventos ou fatos ocorridos, nos quais está incluída a memória episódica, que se refere a informações que estão relacionadas a um lugar e tempo específicos, assim como a memória semântica que se refere a um conhecimento geral não ligado a contexto espacial ou temporal em particular (ERICSSON; KINTSCH, 1995). A memória não declarativa, implícita ou “de procedimento” (procedural) refere-se a várias formas de memória que não estão diretamente acessíveis à consciência. Estas incluem habilidades e hábitos de aprendizagem, condicionamento clássico, assim como “*priming*” ou pré-ativação, que pode ser definido como a habilidade de detectar ou identificar um estímulo como um resultado de uma exposição prévia (ERICSSON; KINTSCH, 1995).

Existem muitas evidências na literatura de que os diferentes tipos de memória são organizados e controlados por sistemas neuroanatômicos distintos (PREDIGER, 2005). Assim, a memória possui quatro componentes essenciais: um componente neocortical não-frontal, que modula a percepção na realização dos testes de memórias implícitas; um componente dos gânglios da base, que interfere nos testes de memórias procedurais sensoriomotoras; um componente temporal medial/hipocampal, que mediará a aquisição, retenção e evocação de memórias explícitas e um componente do lobo frontal que controla as memórias operacionais ou de trabalho (MOSCOVITCH, 1992). Os mecanismos moleculares envolvidos mostram claramente que a memória de curta e longa duração apresentam mecanismos separados, paralelos e independentes (IZQUIERDO *et al.*, 1999; IZQUIERDO *et al.*, 2002). A consolidação permite que a informação lábil sensível nas perturbações seja fixada e estabilizada na rede neural e envolve vários mecanismos como a transcrição de genes ou a síntese de novas moléculas (ALKON *et al.*, 2005).

Como as memórias remotas, uma vez consolidadas, se distribuem difusamente pelo córtex cerebral, a perda de memórias declarativas – denominada demência – acontece quando ocorrem lesões corticais extensas. Isso se dá na DA, na qual ocorre uma excessiva deposição de proteínas anômalas formando corpúsculos e emaranhados que impedem o trânsito de substâncias químicas no corpo celular dos neurônios e nas sinapses. Outras doenças que podem evoluir com quadro demencial são a doença de Parkinson em fase avançada e a síndrome de Down, quando os pacientes atingem idades mais avançadas (BEAR *et al.*, 2008).

1. 4 Hipóteses sobre a etiopatologia da DA

1. 4. 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 e os efeitos neurotóxicos do A β , onde o acúmulo das formas solúveis desse peptídeo leva à toxicidade sináptica e à neurotoxicidade, ocasionando a quebra da homeostase do cálcio, a indução de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (XIAN-HUI *et al.*, 2014).

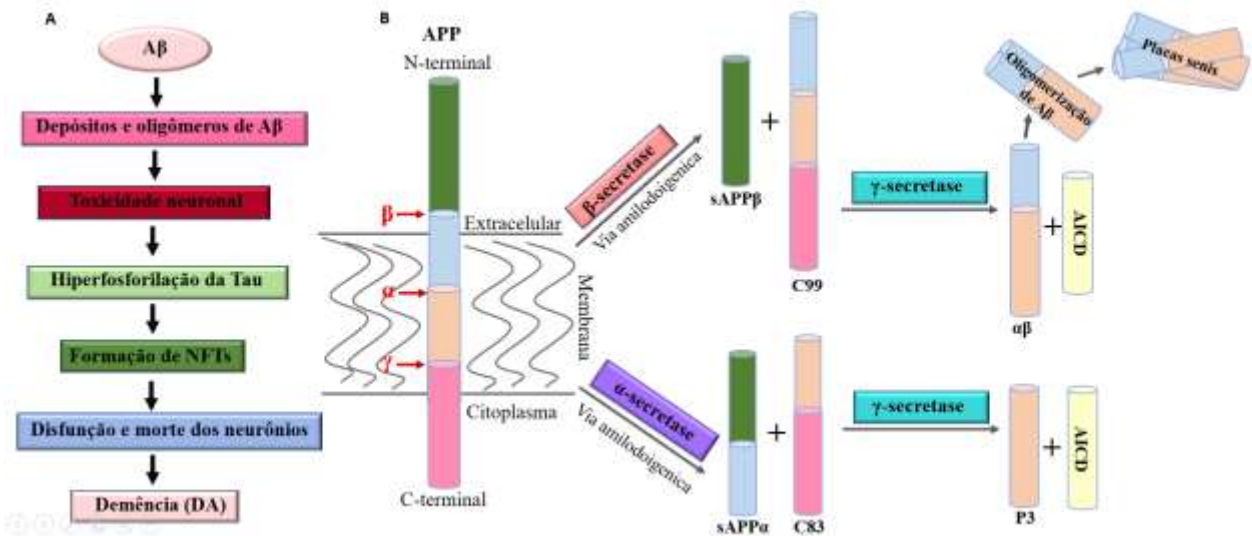
Na DA, a neurodegeneração, a partir da “hipótese da cascata amiloide”, inicia-se com a clivagem proteolítica da APP e resulta na produção, agregação e deposição da substância A β , bem como na conseqüente formação de placas senis. Em condições normais, a APP é degradada por enzimas proteolíticas α -secretases e β -secretase, clivagem não-amiloidogênica ou a amiloidogênica (QUERFURTH; LAFERLA, 2010), respectivamente (FIGURA 1) 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.

A APP pode produzir sAPP α (Proteína precursora de α -amiloide secretada) via a proteólise realizada pela ação da α - secretase, produzindo formas clivadas solúveis, visto não ocorrer a produção do peptídeo A β , e possíveis de serem depuradas do sistema nervoso central (SNC) (LAMMICH *et al.*, 1999). Na via amiloidogênica, o peptídeo A β é gerado a partir da APP por dois eventos de clivagem consecutivos: a atividade proteolítica realizada pela β -secretase, que gera uma extremidade do peptídeo A β , enquanto o complexo enzimático γ -secretase, o qual é constituído pelas proteínas PS1 e PS2 e outras proteínas, gera outra extremidade. O complexo γ - secretase pode agir em três diferentes sítios de clivagem, gerando os peptídeos A β 1–38, A β 1–40 e A β 1–42, os quais são críticos para o processo de agregação do peptídeo A β , com o peptídeo A β 1–42 apresentando o maior grau de propensão a agregação (SUZUKI *et al.*, 1994), como demonstrado na Figura 2, adaptada de Sun e colaboradores (2015).

Tem sido argumentado nos últimos anos que um balanço alterado entre a produção e a depuração do peptídeo A β , que levam ao depósito de oligômeros deste peptídeo no espaço extracelular, o que pode levar a um estresse oxidativo na célula (GELLA; DURANY, 2009). Verificou-se que os peptídeos A β são degradados proteoliticamente no

cérebro, principalmente pela neprilisina (NEP) e pela enzima de degradação da insulina (EDI) (BARANELLO *et al.*, 2015).

Figura 2 – Esquema do Metabolismo da APP



Fonte: (SUN *et al.*, 2015)

A clivagem da APP ocorre pela via não amiloidogênica ("fisiológica") ou amiloidogênica ("patológica"). O local de clivagem utilizado pela γ -secretase na via amiloidogênica determina a formação predominante do peptídeo A β 40 ou o A β 42 com maior poder de agregação e neurotoxicidade

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

1. 4. 2 Diabetes tipo 3

Estudos têm mostrado que a diabetes tipo 2 aumenta o risco do desenvolvimento de DAE em comparação com indivíduos saudáveis (RANI *et al.*, 2016; CHAKRABARTI *et al.*, 2015) e uma forma recém-reconhecida de resistência à insulina no cérebro ou "estado cerebral resistente à insulina" está sendo associada à DA (CRAFT, 2007; De La MONTE, 2009) levantando a hipótese de que a doença de Alzheimer se trata de uma nova forma de diabetes, chamada de diabetes tipo 3.

Apesar de a insulina ser produzida em grande parte pelas células β pancreáticas e atravessar a barreira hematoencefálica, ela pode ser também produzida localmente em algumas regiões do cérebro como hipocampo, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e bulbo olfatório (HOYER, 2003). Além disso, os Receptores de Insulina (RI's) estão

abundantemente presentes no cérebro, mas distribuídos seletivamente, sendo encontrados em maior concentração nos terminais nervosos de regiões-chave do cérebro, como bulbo olfatório, hipotálamo, córtex cerebral, cerebelo e hipocampo (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2007; De FELICE, 2013). O declínio dependente da idade no nível de insulina cerebral (SARTORIUS *et al.*, 2015) e na neurogênese (KEMPERMANN *et al.*, 2002) implicam que a insulina pode estar envolvida na regulação da neurogênese.

A resistência à insulina no tecido periférico é um marcador de diabetes tipo 2 (WHITE, 2002). O acúmulo de evidências sugere que a resistência à insulina no cérebro também causa o desenvolvimento de DA (CRAFT, 2007), assim como os níveis cerebrais baixos de insulina e do RI. Além disso, a deficiência na sinalização da insulina já foi observada em análises *post mortem* e em modelos animais de DA (LESTER-COLL *et al.*, 2006; STEEN *et al.*, 2005; MOLONEY *et al.*, 2010), existindo uma associação entre resistência à insulina e atrofia cerebral e menor memória em idosos com 60 anos de idade (WILLETTE *et al.*, 2013; CRANE *et al.*, 2013; CHERBUIN *et al.*, 2012). Além disso, a sinalização de insulina é particularmente importante para o aprendizado e a memória (CHIU, *et al.*, 2008; DOU *et al.*, 2005), sugerindo que a resistência à insulina pode contribuir para os déficits cognitivos na DA.

A expressão do gene Tau e a fosforilação alterada durante a DA são reguladas por cascatas de sinalização de insulina, apontando para uma relação direta entre a patologia da DA e o sistema de sinalização da insulina (SCHUBERT *et al.*, 2003). Estudos também tem demonstrado que a DA avançada, análoga ao envelhecimento, estaria associada a níveis cerebrais reduzidos de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e genes do RI (WATSON; CRAFT, 2003).

1. 5 Metabolismo da Glicose

O cérebro em conjunto com os principais órgãos periféricos, o coração, o fígado e os rins, é responsável pelo consumo de aproximadamente 60% da energia ingerida pelo corpo em repouso (CUNNANE *et al.*, 2011). Regiões cerebrais relacionadas com aprendizado e memória, tais como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal exibem aumento da utilização de glicose, evidenciada por estudos que utilizam técnicas de tomografia por emissão de pósitrons (HOYER, 2003).

Tanto estudos *in vitro* como *in vivo* têm mostrado que a maior parte da glicose consumida pelo cérebro é utilizada para manutenção dos gradientes iônicos pré- e pós-sinápticos, responsáveis pelas neurotransmissões excitatórias e para manutenção do potencial

de repouso dos neurônios (ATTWELL; IADECOLA, 2002; SHULMAN *et al.*, 2004). Toda a glicose necessária para o funcionamento cerebral é transferida através das membranas celulares e barreiras por duas classes de transportadores específicos saturáveis, os transportadores de glicose independentes de sódio (GLUT) e transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLT) (SHAH *et al.*, 2012).

Os GLUTs são responsáveis pela absorção da glicose do sistema vascular para o cérebro através de três processos, que envolve o transporte através do endotélio que compõe a barreira hematoencefálica (BHE) pela isoforma GLUT1, com peso molecular de 55kDa, para o astrócito, por uma segunda isoforma de 45kDa, que irá transferir a glicose aos neurônios através do GLUT3 (SHAH *et al.*, 2012). Entretanto, a absorção líquida da glicose pelo cérebro dependerá da expressão e atividade do GLUT3, considerado como o principal transportador de glicose, e principalmente das concentrações de glicose nos compartimentos separados pela BHE (DUELLI; KUSCHINSKY, 2001).

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. (JOHN *et al.*, 2003).

Curiosamente, a alteração na sinalização da insulina acelera a produção de A β no cérebro, aumentando o processamento amiloidogênico da APP, que resulta no aumento da fibrilogênese a partir de oligômeros de A β . Assim, a resistência à insulina induzida por oligômeros pode gerar um ciclo vicioso entre o aumento na produção e na agregação, interrompendo as ações fisiológicas da insulina e podendo explicar em parte o acúmulo de A β em cérebros de DA (De FELICE *et al.*, 2014).

Os mecanismos neuropatogênicos envolvidos tanto na resistência à insulina periférica do diabetes tipo 2, como na sinalização da insulina no cérebro de pacientes com DAE, tem mostrado semelhanças no processo de formação do peptídeo A β (De FELICE *et al.*, 2014). Medições em indivíduos com DA mostraram que sinais de captação de glicose cerebral estão diminuídos, independente de atrofia estrutural, e podem ser detectáveis até três décadas antes do início esperado dos sintomas clínicos da DAF (MOSCONI *et al.*, 2006).

1. 6 Diagnóstico e tratamento da DA

O diagnóstico de DA é baseado primariamente em características clínicas apontadas na anamnese e em um exame clínico, especialmente neurológico e psiquiátrico, detalhado (FROTA *et al.*, 2011). O quadro clínico apresenta alterações cognitivas e comportamentais, principalmente relacionadas ao comprometimento da memória episódica e

espacial (MENCHOLA *et al.*, 2015). Exames laboratoriais e de neuroimagem devem ser utilizados no diagnóstico diferencial entre a DA e outras demências (FROTA *et al.*, 2011).

Pesquisas em neuroimagem funcional para o diagnóstico de Alzheimer se concentram em um traçador de PET chamado *Pittsburgh compound B* (PIB), que se liga especificamente em compostos A β , um marcador histopatológico específico da DA (KLUNK, *et al.*, 2004). As escalas, como o *Mini-Mental State Examination* – MMSE e o *Clinical Dementia Rating* – CDR, permitem avaliar a progressão dos sintomas (BLENNOW *et al.*, 2006).

O diagnóstico definitivo, entretanto, é obtido apenas após análise histopatológica de materiais de autópsia. Tal análise revela perda neuronal nas camadas piramidais do córtex cerebral e degenerações sinápticas intensas, tanto em nível hipocampal quanto neocortical, além de identificar os depósitos extracelulares do peptídeo β A, as placas neuríticas ou senis e os ENF intracelulares da proteína Tau hiperfosforilada (PERL, 2000; CHAUHAN; CHAUHAN, 2006; MARTHA *et al.*, 2011).

Segundo Dubois e colaboradores (2007), a progressão da DA se dá em três estágios: (a) estágio pré-clínico assintomático; (b) estágio pródromo, que inclui sintomas moderados (e.x., alterações da memória episódica); (c) estágio sintomático com apresentação de demência.

O diagnóstico precoce da DA baseado somente em sintomas clínicos permanece um desafio, particularmente no estágio pródromo (ALUISE *et al.*, 2008). Essa dificuldade é refletida na baixa acurácia do diagnóstico clínico da DA utilizando métodos que não incluem informações sobre biomarcadores (BEACH *et al.*, 2012).

Atualmente não há nenhum tratamento definitivo para DA e os tratamentos existentes apenas retardam a progressão da doença e controlam alguns sintomas (ROBERT *et al.*, 2009).

Dentre os tratamentos atuais da DA, estão às intervenções psicossociais (Terapia Ocupacional, Fonoaudiologia, Fisioterapia e Psicologia) e as farmacológicas, que são com os fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), os anticolinesterásicos (donezepil, rivastignina e galantamina) que aumentam a disponibilidade da acetilcolina na fenda sináptica, e os fármacos antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (memantina) (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013). Ao bloquear a degradação da ACh, essas drogas prolongam sua meia vida e ação nos receptores colinérgicos pré e pós-sinápticos. Esses medicamentos são incapazes de bloquear a progressão da doença, porém melhoram a qualidade de vida do paciente, existindo, assim, uma grande busca por novas alternativas

terapêuticas, terapias essas que possam ser capazes de atuar diretamente no processo neurodegenerativo da DA (KAR *et al.*, 2004).

Foram exploradas tentativas para reduzir agregados de A β usando várias abordagens, incluindo inibidores de agregação, inibidores de secretase e imunoterapias, tanto em modelos animais como em ensaios clínicos. No entanto, nenhum fármaco desenvolvido com base na hipótese da cascata amilóide tem sido demonstrado que funciona em pacientes com DA (SELKOE; HARDY, 2016).

1. 7 Modelos de DAE em animais

Os modelos transgênicos representam a DAF, a qual é a forma menos prevalente da doença. Mutações dos genes que codificam a APP e a Presenilina 1 e 2 tem sido associados ao desenvolvimento da DAF (GOATE, 2006). Porém, animais com mutação apenas no gene APP acabam desenvolvendo ao longo da vida depósitos extracelular de peptídeos amilóide (MUCKE *et al.*, 2000).

A dupla mutação de genes codificadores da APP com os genes da Presenilina-PS1 ou da BACE1 (enzimas que fazem parte do processamento da beta-amilóide) fazem com que os camundongos desenvolvam a lesão de forma mais acelerada (BODENDORF *et al.*, 2002). Ao contrário do que era esperado, os camundongos duplo transgênicos não apresentaram emaranhados neurofibrilares. Neste contexto surgiu o camundongo triplo transgênico (3xTgAD), para reproduzir as duas lesões presentes na DA. Além de expressar genes codificadores da proteína APP, da Presenilina-AP1, o genoma destes camundongos apresenta também gene humano mutado da proteína Tau (ODDO *et al.*, 2003).

A utilização dos animais transgênicos para pesquisar a DA possui a vantagem de conseguir reproduzir características neuropatológicas, cognitivas e comportamentais semelhantes à doença. Com isso é possível intervir com tratamentos antes do início das patologias. Porém estes modelos em geral não apresentam perda neuronal, o que o torna inadequado para estudar mecanismos de neuroproteção. Também não são os mais adequados para estudar a forma mais comum de DA que é a esporádica, onde as lesões geralmente não causadas por mutações (FRANCO; CEDAZO-MINGUEZ, 2013).

Neste sentido, existe hoje a necessidade da realização de pesquisas com a utilização de modelos não transgênicos, os quais representem a DAE, a qual acomete a grande maioria dos pacientes.

Existem diversos modelos animais que visam mimetizar algumas características neuroquímicas e comportamentais apresentadas na DAE, através de algum dos diversos

caminhos que levam ao estabelecimento da mesma. 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 A β (SARACENO *et al.*, 2013), 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.*, 2009) e o modelo por injeção icv de estreptozotocina (STZ) (LANNERT; HOYER, 1998; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006).

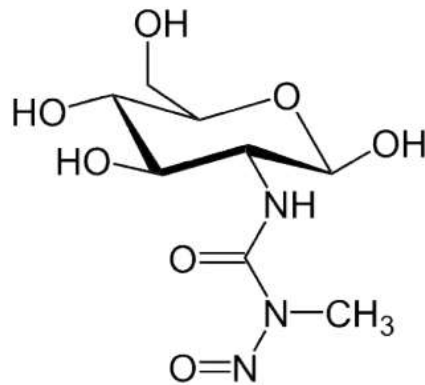
1. 8 Modelo Animal de DAE Induzida por STZ

O STZ (Figura 3) é um composto natural de natureza glicosamina-nitrosouréia, produzido pela bactéria Gram-positiva *Streptomyces acromogenes* (EILEEN DOLAN, 1997), possui estrutura química muito semelhante à glicose, possuindo como diferença apenas uma única substituição da hidroxila em C2 por um grupo nitrosuréia, esta semelhança torna possível que a droga seja carregada para dentro da célula através do transportador de glicose GLUT 2 (LELOUP *et al.*, 1994).

É seletivamente tóxica às células produtoras/secretoras de insulina e não atravessa a BHE, sendo amplamente usada para induzir diabetes experimental em roedores por via intraperitoneal (i. p.) (SZKUDELSKI, 2001).

Quando administrada via periférica, age no pâncreas, destruindo permanentemente as células β pancreáticas produtoras de insulina, originando assim um quadro de DM (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 β através de GLUT do tipo 2, onde provoca a morte celular por metilação e fragmentação do DNA que causa a necrose celular (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; GRIEB, 2016).

Figura 3 – Fórmula molecular do STZ



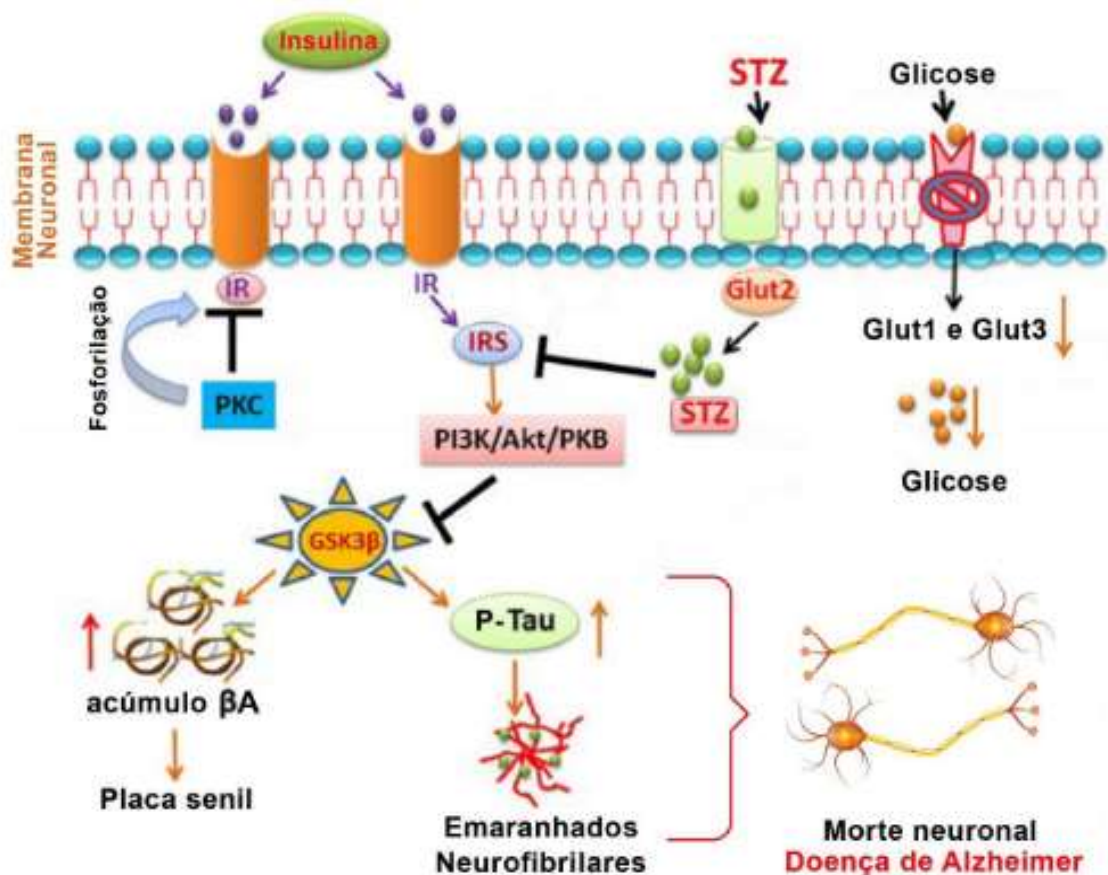
Considerando a presença de insulina e RI no cérebro, um modelo experimental para induzir um estado cerebral de resistência à insulina foi desenvolvido utilizando STZ administrado por via icv com doses de até 100 vezes inferior do que aquelas utilizadas perifericamente (DUELLI *et al.*, 1994; LANNERT; HOYER, 1998).

Quando administrada via icv, em doses menores que a utilizada para indução da diabetes tipo 2 (1-3 mg/kg), o STZ causa uma espécie de dessensibilização dos RI, de IGF, ambos do tipo tirosina cinase, e altera o funcionamento das enzimas envolvidas no metabolismo da glicose cerebral com consequentes alterações bioquímicas e fisiopatológicas semelhantes a algumas das alterações cerebrais observadas durante a DA (AGRAWAL *et al.*, 2011) induzindo a déficits cognitivos (HOYER; LANNERT, 2007; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006, 2007; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013), comprometimento da sinalização colinérgica (BLOKLAND; JOLLES, 1994), estresse oxidativo (KUMAR *et al.*, 2010; SAXENA *et al.*, 2011), redução do metabolismo encefálico da glicose (HOYER; LANNERT, 2007; CHEN *et al.*, 2013) e resistência à insulina no encéfalo (AGRAWAL *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2015). Como o STZ não atravessa a BHE, não ocorre comprometimento sistêmico quando injetada.

O mecanismo de deficiência no funcionamento do 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 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) (THORENS, 2011). Esta enzima fosforila o fosfoinosítídeo 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 A β e a fosforilação

da proteína Tau (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006). As formas citosólico da enzima GSK-3 podem ser: a GSK-3 α e a GSK-3 β (SALKOVIC-PETRISIC; TRIBL; SCHMIDT M. HOYER, 2006; CORREIA *et al.*, 2011). Sendo que a GSK-3 β regula a fosforilação da proteína Tau (CHENG *et al.*, 2005) e a GSK-3 α está associada com a formação do peptídeo A β (PHIEL *et al.*, 2003). Este provável mecanismo de ação está ilustrado na Figura 4 (KAMAT *et al.*, 2015).

Figura 4 – Provável mecanismo de neurotoxicidade induzida pela STZ e a patologia DA.



Fonte: (modificado de KAMAT *et al.*, 2015)

Existe um transportador de glicose na membrana que facilita a entrada da STZ, o GLUT2. Após a entrada de STZ nas células inibe a sinalização do IR e, portanto, PI3K/AKT. A inibição de PI3K e AKT inibe a regulação da GSK-3 β , resultando em um aumento da sua atividade, o que facilita a acumulação de A β e a hiperfosforilação da Tau. O acúmulo de A β promove a formação de placa senil, e a hiperfosforilação de Tau promove a formação de emaranhados neurofibrilares, característica da DA. Por outro lado, as proteínas quinases B/C também inibem o RI pela sua hiperfosforilação e dificultam a função normal da insulina nos neurônios. A STZ também reduz a expressão dos transportadores de glicose GLUT 1 e 3, prejudicando a entrada de glicose na célula.

Trabalhos demonstram que a injeção de STZ em dose subdiabetogênica reduz de 10 a 30% os níveis de glicose, metabolismo de energia, e conseqüentemente, a disfunção mitocondrial, sobretudo em regiões do córtex cerebral e no hipocampo, com diminuição

significativa das principais enzimas da via glicolítica (PATHAN *et al.*, 2005; MICHAŁOWSKA-WENDER *et al.*, 2014).

Embora o mecanismo associado à resistência cerebral à insulina seja bem aceito, ainda não foi robustamente comprovado por dados experimentais (GRIEB, 2016). Além disso, o estresse oxidativo e neuroinflamação subsequentes que levam à morte neuronal é proposto como um segundo mecanismo do STZ (SHARMA; GUPTA, 2001; BASSANI *et al.*, 2017).

Assim, este modelo experimental não transgênico é o modelo animal mais amplamente aceito (DUBEY *et al.*, 2018) e fornece subsídios morfológicos e moleculares para o entendimento da DAE em humanos pela nova hipótese da diabetes tipo 3 (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013; GRIEB, 2016), por possuir várias das características da doença e mimetizar a progressiva deterioração cognitiva e do metabolismo energético encefálico (GRÜNBLATT *et al.*, 2004; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013).

1. 9 Terpenos e neuroproteção

Os terpenos são metabólitos secundários de plantas que são produzidos, em parte, como defesa contra microrganismos e insetos, além de serem polinizadores atraentes (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007).

Caracterizam-se por serem substâncias lipofílicas, ou seja, insolúveis em água, e é essa sua característica, que indica a facilidade de uma molécula ser ou não transportada através de uma membrana (MAZZATORTA *et al.*, 2005). São classificados de acordo com sua unidade de isopreno como monoterpeneo, diterpeneo, triterpeneo e sesquiterpeneo (MURAKAMI *et al.*, 2004).

Os membros dessa classe de substâncias químicas possuem estruturas de carbono que podem ser decompostas em resíduos de isopreno (C_5H_8) e são classificados, com base no número de carbonos na molécula, como monoterpeneos (10 carbonos), sesquiterpeneos (15 carbonos), diterpeneos (20 carbonos), triterpeneos (30 carbonos) e tetraterpeneos ou carotenos (40 carbonos) (TEISSEIRE, 1994).

Os sesquiterpeneos são um grupo de metabólitos secundários presentes em uma grande variedade de famílias de plantas e que apresentam uma série de efeitos biológicos e farmacológicos (Di SOTTO *et al.*, 2010), como efeito antibacteriano, antifúngico e antioxidante (MURAKAMI *et al.*, 2004). Muitos sesquiterpeneos já foram identificados. Plantas marinhas e terrestres e alguns microrganismos são fonte de derivados oxidados ou modificados destes compostos (ROBLES *et al.*, 1995).

Durante anos tem havido uma atenção emergente para a produção e implementação dos óleos essenciais na medicina popular. Os óleos essenciais são compostos principalmente por terpenos e terpenóides com baixo peso molecular (De CARVALHO; Da FONSECA, 2006).

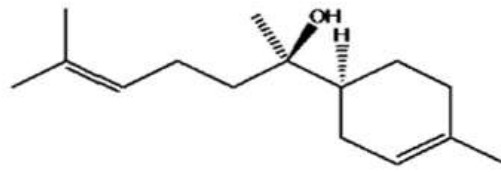
Cioanca e colaboradores (2013) demonstraram que o óleo essencial extraído da *Coriandrum sativum*, popularmente conhecido como coentro, foi capaz de melhorar a memória de animais expostos ao A β pela diminuição do estresse oxidativo. Mais recentemente, estudos realizados por Marumoto e colaboradores (2017) demonstraram a inibição da atividade da Beta Secretase 1 (BACE1) por compostos aromáticos (monoterpenos, sesquiterpenos), indicando que estes podem ser uma possível estratégia terapêutica para prevenir a doença de Alzheimer.

1. 10 α -Bisabolol

O α -bisabolol (FIGURA 5), também conhecido como levomenol, é um álcool de sesquiterpeno monocíclico natural insaturado, não tóxico (ORTIZ *et al.*, 2018). O α -bisabolol é o principal constituinte dos óleos essenciais de várias plantas, encontrado como constituinte majoritário do óleo essencial da *Matricaria chamomilla*, popularmente conhecida como camomila, da *Vanillosmopsis erythropappa* e da Peperônia (REYNOLDS 1996; De LIRA *et al.*, 2009), da camomila alemã (*Matricaria recutita*), *Plinia cerrocampanensis* Barrie (Myrtaceae), *Stachys lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) e *Laserpitium zernyi* Hayek (Apiaceae) (BARRETO *et al.*, 2016; MCKAY; BLUMBERG, 2006; POPOVIĆ *et al.*, 2010; VILA *et al.*, 2010). Entretanto, dentre essas fontes de α -bisabolol, a mais utilizada para sua extração é a camomila, que pode conter até 50% (VILA *et al.*, 2010).

O α -bisabolol passou a ser utilizado como um componente de perfumes e cosméticos decorativos, na produção de xampus, sabonetes e produtos de higiene, bem como em outros produtos não-cosméticos, tais como os detergentes (LEITE, 2011). Além disso, o α -bisabolol tem sido utilizado como um agente calmante em cosméticos para bebês (BHATIA *et al.*, 2008).

Figura 5 – Estrutura molecular do α -bisabolol.



(nome IUPAC: (2R) -6-metil-2 - [(1R) -4 - metilciclo-hex-3-en-1-il] hept-5-en-2-ol)

O α -bisabolol possui baixo peso molecular e, apesar de caracterizar-se por ser um composto lipofílico, conseqüentemente, pouco solúvel em fluidos biológicos, estudos demonstraram em um modelo *in vitro* da BHE que o α -bisabolol apresenta características físico-químicas compatíveis com a capacidade de atravessar a BHE (PIOCHON *et al.*, 2008) e estudos recentes de Tabari e Tehrani (2017) descreveram os efeitos ansiolíticos e sedativos do α -bisabolol em camundongos, reforçando essa capacidade.

Esse terpeno possui uma variedade de atividades biológicas, tais como: antifúngica (VILA *et al.*, 2010), antinociceptiva em ratos (LEITE *et al.*, 2011; KESMATI *et al.*, 2007), anti-tumororal (Da SILVA *et al.*, 2010) e atividade gastroprotetora (BEZERRA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010). Em outros estudos, o α -bisabolol suprimiu os comportamentos nociceptivos de maneira independente da dose no teste da formalina da pata, hipernocicepção inflamatória da pata e testes de dor orofacial (BARRETO *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2011a; TOMIĆ *et al.*, 2014).

Estudos mostraram que o α -bisabolol foi capaz de proteger a mucosa gástrica de camundongos Swiss machos com lesões causadas pelo etanol, por reduzir a peroxidação lipídica e aumentar a atividade da enzima superóxido desmutase, estando essa atividade relacionada com o seu efeito antioxidante (ROCHA *et al.*, 2011). O α -bisabolol apresentou também uma atividade protetora contra os danos gástricos causados por ácido acetilsalicílico (KHAYYAL *et al.*, 2001).

Além disso, estudos mostraram que α -bisabolol atua na reação inflamatória através da inibição da produção de NO e PGE₂, que são mediadores pro-inflamatórios. Além disso, o α -bisabolol reduziu a expressão dos genes que codificam iNOS e COX-2, inibindo a via de sinalização NF- κ B e ativação da proteína-1 (AP-1) dos fatores de transcrição (p38 e ERK) (KIM *et al.*, 2011). Estes achados sugerem que o α -bisabolol pode ser usado como um agente terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias.

Um estudo mostrou que o α -bisabolol atua nos canais de cálcio dependentes de voltagem, inibindo as respostas contráteis no músculo liso traqueal, preferencialmente

causadas pelo influxo de cálcio (SIQUEIRA *et al.*, 2012). Esse mesmo efeito foi observado em estudos com preparações de aorta (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

Estudos com cultura de células PC12 têm demonstrado o efeito anti-amiloidogênico e anti-apoptótico do α -bisabolol contra a neurotoxicidade induzida por A β , onde os resultados demonstraram que o α -bisabolol reduziu significativamente a propensão de agregação de A β (SHANMUGANATHAN *et al.*, 2018). Outros estudos também demonstraram seu potencial anticolinesterásico e de anti-agregação amiloidogênica do composto bioativo α -bisabolol presente na alga castanha *Padina gymnospora* (SHANMUGANATHAN, 2015).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o α -bisabolol tem efeito neuroprotetor e protege contra déficits cognitivos em modelo de isquemia cerebral focal permanente em camundongos (FERNANDES *et al.*, 2018).

Até o momento, nenhum trabalho foi realizado associando a atividade do α -bisabolol com a DA em animais induzido pela injeção STZ, sendo o nosso estudo um pioneiro nessa investigação.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida, especialmente em países desenvolvidos, a prevalência de doenças neurodegenerativas, vem aumentando rapidamente e as terapias atuais, ainda ineficientes, em sua maior parte, estão voltadas apenas para a diminuição da progressão dos sintomas e não para a prevenção ou tratamento destas doenças. Para uma melhor identificação de potenciais alvos terapêuticos tendo em foco essas doenças, como a Doença de Alzheimer Esporádica (DAE), é preciso entender melhor os mecanismos celulares e moleculares pelos quais essas patologias se desenvolvem.

A DAE certamente tem um início muito mais precoce, talvez com manifestações subclínicas, que ocorrem décadas antes do surgimento das alterações cognitivo-comportamentais da doença, com a evolução do quadro clínico. Estudos epidemiológicos têm fornecido evidências diretas de que o Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 é um forte fator de risco para DA e o estado de resistência à insulina tem sido reconhecido por desempenhar um papel importante na fisiopatologia da DAE.

Como foi citado, o α -bisabolol possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-apoptótica, anti-amiloidogênica, inibição da colinesterase, e protege contra déficit cognitivo em modelo animal de lesão cerebral. Com isso, é possível que o α -bisabolol seja capaz de agir como neuroprotetor evitando os danos neuronais e cognitivos causados pela injeção de STZ nesse modelo de DAE.

Desse modo, este trabalho busca investigar o possível efeito de neuroproteção do α -bisabolol sobre o dano neuronal e déficits cognitivo induzido pela injeção icv de STZ em camundongos, bem como a prospecção do α -bisabolol como uma possível estratégia terapêutica na DAE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito neuroprotetor do α -bisabolol em um modelo animal de DAE induzido por STZ;

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial neuroprotetor do α -bisabolol sobre:
 - ✓ Os déficits cognitivos induzidos por STZ no modelo de DAE;
 - ✓ O estresse oxidativo;
 - ✓ Os danos sinápticos sobre as sinapses;
 - ✓ Formação de placas amiloidogênicas;
 - ✓ A viabilidade celular e dano neuronal;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos adultos da estirpe *Swiss*, machos, com peso compreendido entre 25-35 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, forradas com raspas de madeira à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com ciclo de claro/escuro de 12h/12h e alimentados com ração padrão e água à vontade.

No que se refere aos cuidados com os animais, todos os procedimentos realizados no estudo seguiram os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número de registro 39/2017 (Anexo A).

4.2 Drogas

As seguintes substâncias foram utilizadas: Estreptozotocina (SIGMA-USA), α -bisabolol (SIGMA-USA), Quetamina (König, Argentina), Xilazina (König, Argentina). Os demais reagentes foram de grau analítico.

4.3 Modelo de Doença de Alzheimer Esporádica (DAE) induzido por Estreptozotocina (STZ)

Os procedimentos de lesão foram realizados através do procedimento de indução estereotáxico. Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg intraperitoneal (i.p.)) e quetamina (100 mg/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 a superfície do cérebro (PAXINOS; FRANKLIN, 2004)

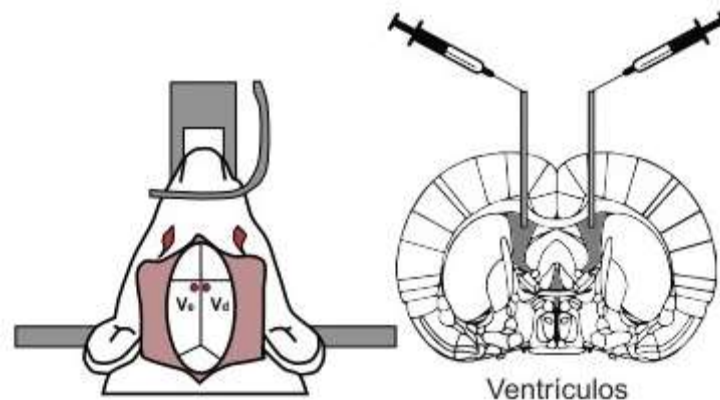
(Tabela 1). Esse modelo experimental de lesão foi proposto por Lannert e Hoyer (1998). Foram realizadas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação (Dremel) em cada marcação, permitindo entrada da seringa *Hamilton* com o STZ (3 mg/kg) sendo injetado icv bi-lateralmente no dia 1 e 3 do experimento, em ambos ventrículos, sendo infundido 1,5 μ l (45 μ g/1,5 μ l) em cada hemisfério (SHARMA; GUPTA, 2001) (FIGURA 6). As micro-injeções foram realizadas por administração de STZ ou solução de veículo, 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 algodão (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 infusão de artificial Fluido Cérebro Espinal (aCSF) estéril (veículo, solução de NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, C₆H₁₂O₆).

Tabela 1 – Sítios das micro-injeções bilaterais de STZ nos ventrículos laterais

| Coordenadas | Ponto 1 (ventrículo E) | Ponto 2 (ventrículo D) |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Antero-posterior | - 0,5 | - 0,5 |
| Médio-lateral | - 1,1 | + 1,1 |
| Ventral | + 2,8 | + 2,8 |

Coordenadas descritas por Paxinos e Franklin, 2004

Figura 6 – Esquema das seções de micro-injeções.



À esquerda, mostrando as regiões do crânio onde foram realizados os furos para ter acesso aos ventrículos direito e esquerdo, e à direita mostrando o corte coronal da região onde foram realizadas as injeções de STZ.

4. 4 Protocolo Experimental

O tratamento com o α -bisabolol foi feito com as doses 50, 100 ou 200 mg/kg ou veículo (Tween 3% em salina) por via oral (v.o.), uma hora após os procedimentos de indução e diariamente durante os 15 (quinze) dias que seguem após o segundo procedimento de indução, utilizando Tween 3% em salina v.o. As doses de 50, 100 ou 200 mg/kg foram utilizadas baseado em estudos que demonstraram que o α -bisabolol (100 ou 200 mg/kg) apresentou efeito neuroprotetor e diminuição nos déficits cognitivos em modelo de isquemia cerebral focal permanente em camundongos (FERNANDES *et al.*, 2015). A dose de 50 mg/kg foi feita em decorrência da necessidade de se avaliar o efeito do uso da dose menor, pois neste estudo foi feito um maior período de tratamento.

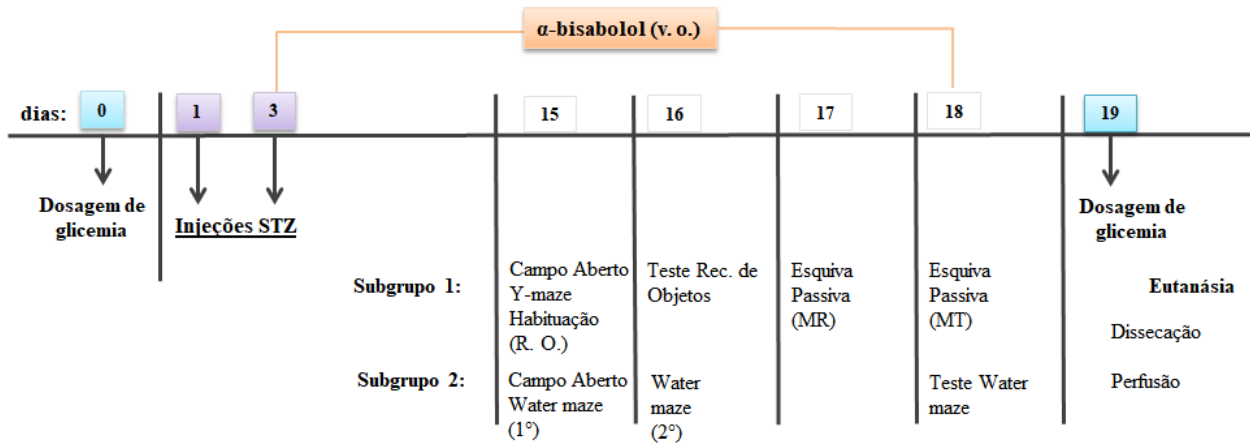
Foram utilizados um total de 120 animais divididos em 6 grupos experimentais, cada um com 20 animais de acordo com a Tabela 2. Os animais de cada grupo foram divididos em 2 subgrupos de 10 (dez) animais. Os animais do primeiro subgrupo foram submetidos a testes para avaliar a atividade locomotora (teste do campo aberto) e avaliação de memória (teste do labirinto em Y, teste do reconhecimento de objetos e teste da esQUIVA passiva). Os animais do segundo subgrupo foram submetidos aos testes para avaliar a atividade locomotora (teste do campo aberto) e avaliação de memória espacial (teste do labirinto aquático). Os testes empregados foram realizados de acordo com o desenho experimental abaixo (FIGURA 7). Os testes de comportamento foram realizados 12 (doze) dias após a segunda injeção de STZ ou de aCSF.

Após os testes de comportamento, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para a retirada das áreas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) para realização das análises do estresse oxidativo (n=6) (TBARS e Nitrito), isolamento de sinaptossomas e de membranas totais para a quantificação da densidade de marcadores sinápticos (sinaptofisina) por *Western blotting* (n=4). Para as análises imunohistoquímicas (n=4), os animais foram anestesiados e perfundidos com paraformaldeído a 4% em PBS (tampão fosfato 0,1 M contendo salina 0,9 %, pH 7,4). Os cérebros foram removidos, fixados em formol tamponado a 10% por 24 h e posteriormente crioprottegidos em sacarose a 30% em PBS a 4° C, posteriormente foram feitos os cortes histológicos para análise da acumulação de placas senis de A β (Tioflavina S) e da morte neuronal (Cresil Violeta).

Tabela 2 - Protocolo experimental

| Grupo | Tratamento | |
|-------|---------------|-----------------------------------|
| | icv | v. o. |
| 1 | aCSF | + Veículo (Tween 3% + salina) |
| 2 | aCSF | + α -bisabolol (200 mg/kg) |
| 3 | STZ (3 mg/kg) | + Veículo (Tween 3% + salina) |
| 4 | STZ (3 mg/kg) | + α -bisabolol (50 mg/kg) |
| 5 | STZ (3 mg/kg) | + α -bisabolol (100 mg/kg) |
| 6 | STZ (3 mg/kg) | + α -bisabolol (200 mg/kg) |

Figura 7 – Desenho experimental mostrando a sequência dos testes comportamentais realizados nos subgrupos de animais.



4.5 Dosagem da glicemia

A dosagem da glicemia foi realizada em todos os animais, sendo feita sem restrição alimentar, para confirmar que os animais não estavam diabéticos. As dosagens foram feitas imediatamente antes dos procedimentos de indução e 16 dias após as injeções de estreptozotocina. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica estéril, uma gota de sangue foi obtida através da perfuração da ponta da cauda dos animais. Essa amostra de sangue, foi aplicada sobre a fita teste usada para leitura no medidor de glicose, sendo os resultados obtidos em mg/dL. Camundongos com glicemia de jejum superiores a 200 mg/dL e peso corporal acima de 55 g são classificados como diabéticos (TABAK *et al.*, 2012).

4. 6 Testes comportamentais

4. 6. 1 Avaliação da Atividade Locomotora - Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto foi originalmente descrito por HALL (1934), para analisar o estado emocional em ratos. O teste utilizado neste trabalho foi baseado no modelo de BROADHURST (1957) e foi utilizado com o intuito de avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório do animal, pois essa atividade medida pela distância que um animal percorre reflete a exploração a um contexto novo.

O campo aberto consiste de uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico com o piso preto dividido em nove quadrantes iguais (FIGURA 8). No teste, o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por 5 minutos, durante este período foram registrados por meio do software ANY-maze (versão 4, USA), a distância percorrida, a velocidade média, o número de quadrantes atravessados pelo animal (número de cruzamentos) e o número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente (explorações verticais), mantendo-se apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório do tipo *rearings*. O ambiente foi iluminado com luz vermelha e a arena foi limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferisse no teste.

Figura 8 – Arena do Campo Aberto



Fonte: (Laboratório de Neurociências e Comportamento - LNC)

4. 6. 2 Avaliação sobre a Memória

4. 6. 2. 1 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 labirinto em Y é composto por 3 braços de madeira com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (FIGURA 9). Neste teste, o animal foi colocado em um dos braços e foi feita a contagem das alternações espontâneas as entradas nos outros braços durante 8 (oito) minutos. Os animais controles apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes sem repetição.

Todas as entradas em cada braço foram sequencialmente anotadas, havendo, assim, o registro do número total de entradas em cada braço, bem como a sequência de entradas. As informações foram analisadas para determinar o número de entradas do braço sem repetição. Os dados foram expressos como a porcentagem de alternância nos braços sem repetição.

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem lembrar em qual braço eles entraram por último (LALONDE, 2002). O resultado é expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática:

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

Figura 9 – Labirinto em Y

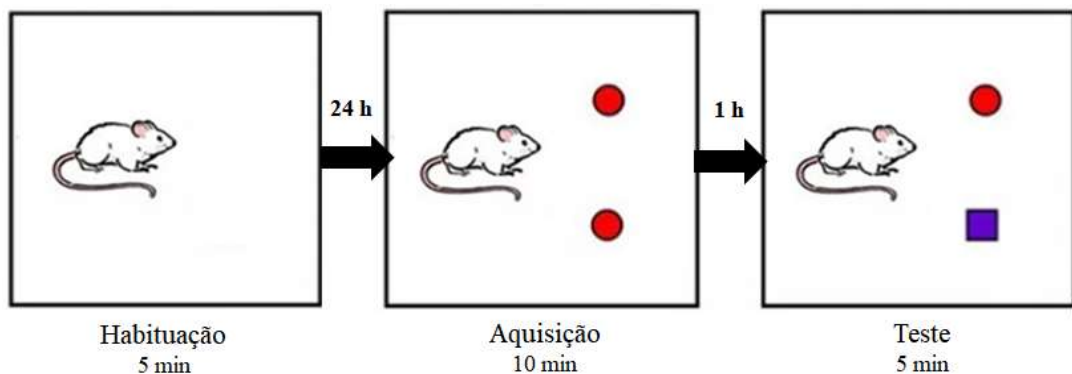


Fonte: (LNC)

4. 6. 2. 2 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) (FIGURA 10). Os animais foram ambientados na arena de campo aberto 24 h antes da realização do teste. O teste de reconhecimento de objetos foi realizado 13 dias após a segunda injeção STZ. O teste foi realizado na arena do campo aberto, onde dois objetos idênticos, colocados em lados opostos, foram colocados nos cantos da arena. 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 deixado para explorar o ambiente por 10 min. Na segunda, realizada uma hora depois, o objeto situado à direita foi substituído por um novo objeto, e foi medido o tempo de exploração em cada objeto (antigo e novo) durante 5 minutos. O índice de reconhecido ou de discriminação foi 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. A arena e os objetos foram limpos com álcool a 20 % entre os testes. Os seguintes comportamentos foram 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 ≤ 1 cm.

Figura 10 – Ilustração representando a metodologia do teste de reconhecimento de objetos.



Fonte: (Desenho adaptado de Kate Fehlhaver, Knowing Neurons)

4.6.2.3 Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva

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. 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.

Após 14 dias do procedimento de indução com STZ, os animais foram habituados ao aparelho de esquiva passiva (Insight LTDA). O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22 cm), tendo este o piso eletrificado e uma plataforma não eletrificada (FIGURA 11). O animal foi colocado na plataforma e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 minuto, e depois retirado. Após 30 segundos, o animal foi colocado novamente na plataforma. Visto que a tendência do animal é explorar o ambiente, ao descer da plataforma, ele recebe um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para descer sendo registrado, até um máximo de 300 s (treino). Os animais que não desceram da plataforma levaram o mesmo choque após os 300 s de treino.

O animal foi retirado e, após 15 minutos, colocado novamente na plataforma, sendo registrada a latência de descida (memória recente). A retenção do aprendizado foi testada após 24 horas (memória tardia), mas nessa fase, os animais não levaram choque.

Figura 11 – Aparelho de Esquiva Passiva

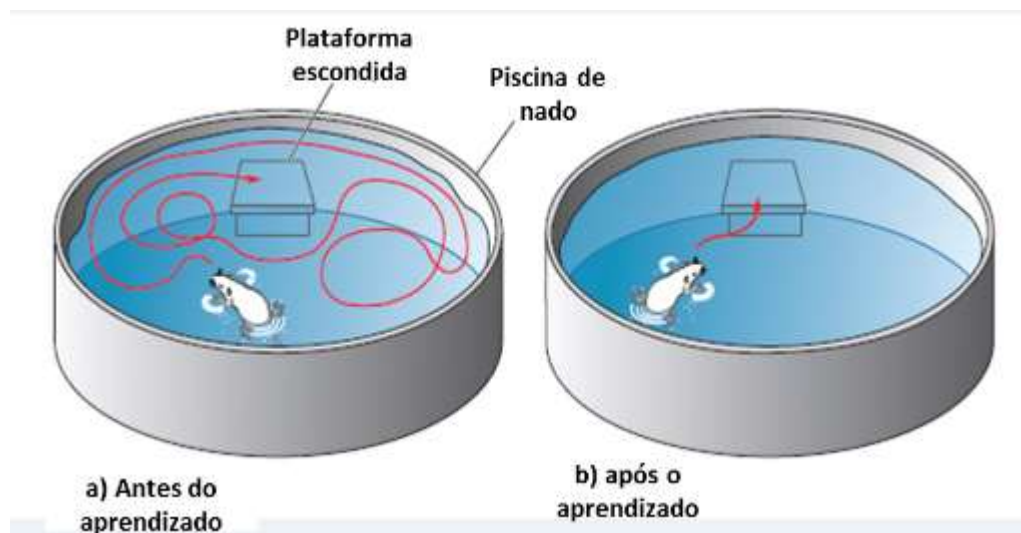


Fonte: (Insight LTDA.)

4. 6. 2. 4 Avaliação da memória espacial - Teste do Labirinto Aquático

Com o objetivo de avaliar o aprendizado e a memória (longo-prazo) visuoespacial, foi utilizado o labirinto aquático com pistas de Morris ou Water maze (FIGURA 12) (MORRIS, 1984). O animal foi colocado de forma aleatória em uma piscina circular (90 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade) contendo água turva (até 30 cm de altura) com tinta branca não tóxica à 26°C, dividida espacialmente em quatro quadrantes, devendo encontrar uma plataforma (7cm de diâmetro) submersa 2cm. O animal teve 60s para achar a plataforma (que permanece no mesmo local em todos os treinos) e lá permanecer por 10s. Este treino foi realizado seis vezes por dia com intervalos de 30s entre os treinos, durante dois dias (aprendizagem) e 48 h após o último treino, os animais foram submetidos ao teste, agora sem a plataforma, onde foi avaliada a aquisição da memória. O animal permaneceu na piscina por 60s e foi registrado o tempo em que o animal permaneceu 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 cruzou o local exato da plataforma.

Figura 12 – Labirinto aquático com pistas



Fonte: (LNC)

4. 7 Avaliação do Estresse Oxidativo

4. 7. 1 Determinação da peroxidação lipídica

A atividade antioxidante foi medida pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DRAPER; HADELY,1990), um indicador de peroxidação lipídica. No dia do ensaio, 60 µL do homogenato (10% em tampão fosfato) de córtex e hipocampo foi introduzido em tubo de ensaio e centrifugado a 1200 rotações por minuto (rpm) 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação, 100 µL de ácido perclórico a 35% foi adicionado para interromper a peroxidação e, centrifugado novamente a 5000 rpm 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e a este foi adicionado 50µl de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Posteriormente, levado ao banho de água por 30 minutos a uma temperatura variável de 95-100°C. A solução, foi retirada e colocada para esfriar a temperatura ambiente. Após esfriar, 150 µL da solução foi adicionada nos poços da placa de ELISA e foi feita a leitura em 535 nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de malonaldeído (MDA) padrão e os resultados foram expressos em concentração (µM).

4. 7. 2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

Nesse ensaio o reativo de Griess (N-1-naftiletlenodiamina a 0,1% em água bidestilada, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) revela a presença de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorbância em 540 nm (GREEN *et al.*, 1982).

Para realização do ensaio, os homogenatos (10% em tampão fosfato) de córtex pré-frontal e hipocampo foram centrifugados a 12000 rpm por 15 min a 4°C e 100 µL de cada sobrenadante foi adicionado a 100 µL do reagente de Griess. Para o branco, foi utilizado 100 µL do tampão fosfato e 100 µL reagente de Griess. Após 10 minutos, foi feita a leitura das absorbâncias em 540nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de nitrito padrão e os resultados foram expressos em concentração (µM). As leituras da absorbância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então foi feita a determinação da equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra.

4. 8 Análise histopatológica

Após a anestesia, os animais foram perfundidos através do coração, pelo ventrículo esquerdo com salina gelada(8°-10°C), seguido de paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e pós-fixados com formol tamponado por 24 (vinte e quatro) horas. Após esse período, foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30%. O tecido foi cortado no criostato e montado em lâminas silanizadas. Os cortes histológicos de 10µm foram então corados pela técnica de Violeta de Cresil para a verificação de morte neuronal e Tioflavina S para verificação das placas de *senis*.

4. 8. 1 Marcação de placas amiloides de $A\beta$ – Tioflavina S

Para visualização de placas amiloides foi realizada o método de coloração pela Tioflavina S. A Tioflavina S é uma mistura de corante homogênea que resulta da metilação da desidrotiotidina com ácido sulfônico. As secções de córtex e hipocampo (10 µm) foram montadas em lâminas e deixadas para secar ao ar antes da coloração. Foi utilizado o protocolo estabelecido por LY e colaboradores (2011).

As lâminas foram imersas em etanol 70% e 80 %, por 1 minuto em cada banho. Em seguida, foram incubadas em solução de Tioflavina S (1% em 80% de etanol) filtrada (filtro de 0,2 µm) por 15 minutos, protegido da luz. Após, foram imersas novamente em etanol 80% e 70%, respectivamente, por 1 minuto cada banho. As lâminas foram montadas em meio de montagem aquoso e deixadas para secar no escuro durante pelo menos 2 horas, seguida de vedação com esmalte. As lâminas foram armazenadas no escuro a 4° C. As placas verdes fluorescentes coradas podem ser visualizadas com microscopia fluorescente. A análise das lâminas foi feita dentro de uma semana, pois a coloração desaparece com o tempo. As fatias foram fotografadas logo após a coloração, utilizou-se o *Cytation 3* para a obtenção das imagens.

Para a quantificação, foram selecionadas 3 fatias de cada animal, aleatoriamente, sendo utilizado o aumento de 25x para as fatias do hipocampo e o aumento de 200x para as fatias do córtex pré-frontal.

4. 8. 2 Avaliação da viabilidade celular através do Violeta de Cresil

Neste estudo, a viabilidade celular foi analisada pela coloração de cresil-violeta. A coloração de cresil-violeta é utilizada para evidenciar os corpúsculos de Nissl presentes no citoplasma de neurônios viáveis (SCORZA *et al.*, 2005).

As lâminas com os cortes cerebrais de córtex e hipocampo foram mergulhadas em água destilada durante um minuto, posteriormente, foram incubados na solução de cresil-violeta 0,5% preparada em tampão de acetato (20 % acetato de sódio 2,7% + 80% de ácido acético glacial a 1,2 %), por um período de três minutos. A fixação da marcação foi feita com duas lavagens em tampão de acetato. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool (50, 70 e 100%). Por fim, foram mergulhadas em xilol e montadas com *entellan* (Merck, Alemanha).

Para a quantificação dos neurônios corados com Nissl, As lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Elipse E200) com aumento de 200x. Foram selecionadas 3 fatias de cada animal, aleatoriamente, e a quantificação dos neurônios corados foi realizada em todas as imagens utilizando o software *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA) com um *gride* de 1000. No hipocampo, foram analisadas as subáreas CA1 (Corno de Amon 1), CA3 (Corno de Amon 3) e GD (Giro Denteado). Foi calculada a média dos 3 valores por animal, e os resultados expressos como número de células viáveis. As células foram consideradas neurônios viáveis quando apresentaram coloração violeta no citoplasma, bem como, aspectos morfológicos normais (células de forma redonda ou oval com núcleos centralizados).

4. 8. 3 Avaliação da degeneração neuronal através do Fluoro Jade C

A técnica de Fluoro-Jade C, foi utilizada para investigar degeneração neuronal. As lâminas foram imersas, durante 5 minutos numa solução básica de álcool, que consiste em: 0,01% de NaOH (0,01g para 100ml) em 80% de etanol, e depois em etanol a 70% durante 2 minutos e água ultrapura durante 2 minutos. Em seguida foram incubados sob agitação, em 0,06% de permanganato de potássio durante 10 minutos, (protegidos da luz), lavadas em água durante 2 minutos e incubadas, sob agitação durante 10 minutos, na solução 0,0001% de Fluoro-jade C, em 0,1% de ácido acético, e lavadas novamente em águas ultrapura 3 vezes (1 minuto de cada vez). Após secagem das lâminas (ao ar livre), as lâminas foram mergulhadas

em xilol (câmara de exaustão) durante 1 minuto e montadas com o meio de montagem *Entellan* (SCHMUED *et al.*, 2005).

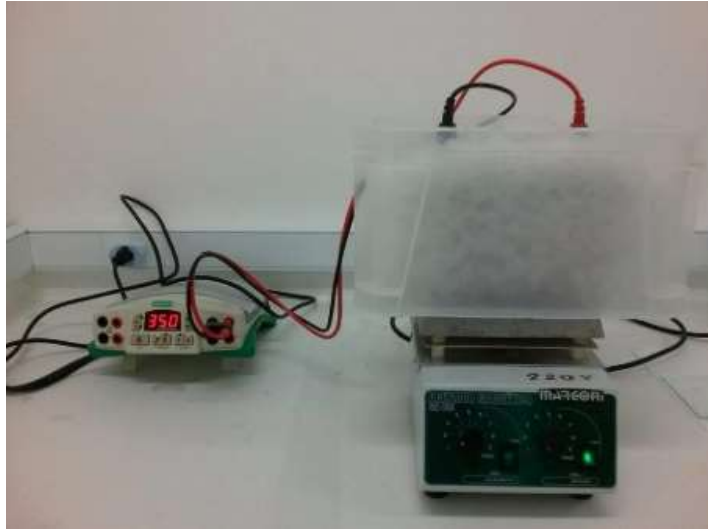
A marcação com Fluoro-jade C foi quantificada em séries de 3 seções coronais (10 µm de espessura e espaçamento de 300µg), representativas do córtex pré-frontal e hipocampo de 4 animais de cada grupo experimental, utilizando o aumento de 200x. No hipocampo, foram analisadas as subáreas CA1 (Corno de Amon 1), CA3 (Corno de Amon 3) e GD (Giro Denteado). A quantificação das células positivas foi calculada através do programa Image J, sendo representados como média ± EPM.

4. 9 Avaliação da expressão de proteínas de sinapse, sinaptofisina através da técnica de *Western-blot*

A avaliação da expressão da proteína de sinaptofisina foi feita nas amostras de tecido de córtex e hipocampo. As amostras foram homogeneizadas separadamente em *potter* com 2 mL de tampão de sacarose 32 mM, EDTA 1 mM, Hepes 10 mM e BSA 1 mg/mL. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 3.000 G durante 10 min a 4°C, para remoção de *debris*. O sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação a 25.000 G durante 90 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensão em 100µL de uma solução de SDS a 5% com inibidor de protease (5µL/mL). A quantidade de proteína total presente na amostra foi determinada usando o método de Lowry, e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

As amostras foram desnaturadas por adição de um tampão contendo – Tris 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, SDS 4%, e de Azul de Bromofenol 0,02% - seguida de aquecimento a 90°C durante 5 min. Quantidades iguais de proteínas totais (25 µg) foram aplicadas em cada poço de gel de poliacrilamida-SDS 12,5 %, utilizando-se o sistema *Mini Protean®3Cell* (Bio-Rad, EUA) (FIGURA 13). Adicionou-se tampão de corrida (Tris 25 mM; Glicina 192 mM e SDS 0,1%) e em seguida iniciou-se a corrida em condições constantes de voltagem (120 V) e variável de miliamperagem (80 mA) por 1 hora e 45 min. Após a separação protéica, deu-se início a transferência (por 3 horas, 100 V, 395 mA) para a membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF) (Bio-Rad), previamente ativada por imersão em metanol durante 5 s, seguida de uma imersão de 5 min em água, e finalmente em tampão de eletrotransferência (Tris 25mM; Glicina 192mM e Metanol 20%) durante 5 min.

Figura 13 – Sistema de *Western blotting* montado.



Fonte: (LNC).

A transferência foi verificada corando-se as membranas com solução de Ponceau S, para verificação da qualidade do processo. Logo em seguida, as membranas foram lavadas (descoradas) com água destilada e bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS-T por uma hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram incubadas por um período de 1 hora em TBS-T contendo os seguintes anticorpos: camundongo anti- α tubulina (1:5000; Sigma), coelho anti-sinaptofisina produzida em camundongo (1:2000; Santa Cruz Biotechnology). A seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 lavagens) e incubadas com os anticorpos secundários marcados com peroxidase: anti-IgG de camundongo (1:2000; Millipore) por 1 hora.

Após a incubação por 1 h, a membrana foi novamente lavada com TBS-T (3 lavagens) e a reação de desenvolvimento da cor se processou com a mistura de 5mg do cromógeno DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride-Sigma) em 15 mL de TBS-T e 50 μ L de peróxido de hidrogênio por 5 min. Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e posteriormente secada em temperatura ambiente e, no final, guardada ao abrigo da luz.

Para a análise densitométrica, as bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do *software Image J versão 1.32j* de domínio público <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) onde a densidade óptica de cada banda foi detectada. Inicialmente, o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade óptica para a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar todas as bandas (uma de cada vez) visíveis no filme, não devendo ser alterada, quando se passa a

analisar outra banda. Foi feita a relação snaptofisina/tubulina e o valor final de intensidade relativa foi expresso em porcentagem em relação ao grupo aCSF + veículo de todos os experimentos realizados.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo *Software GraphPad Prism 6.01* (GraphPad Software, Inc.) e todos os dados expressos como média \pm EPM (erro padrão médio). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade D'Agostino e Pearson para verificar se dados apresentam distribuição normal, sendo determinado o uso de testes paramétricos para a avaliação estatística dos resultados.

Nos resultados que apresentaram uma distribuição normal, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni como teste post-hoc, para comparações dentro dos grupos. Para comparações entre dois grupos, utilizou-se o teste *t* de *Student*. Em todos os testes o critério de significância utilizado foi de $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

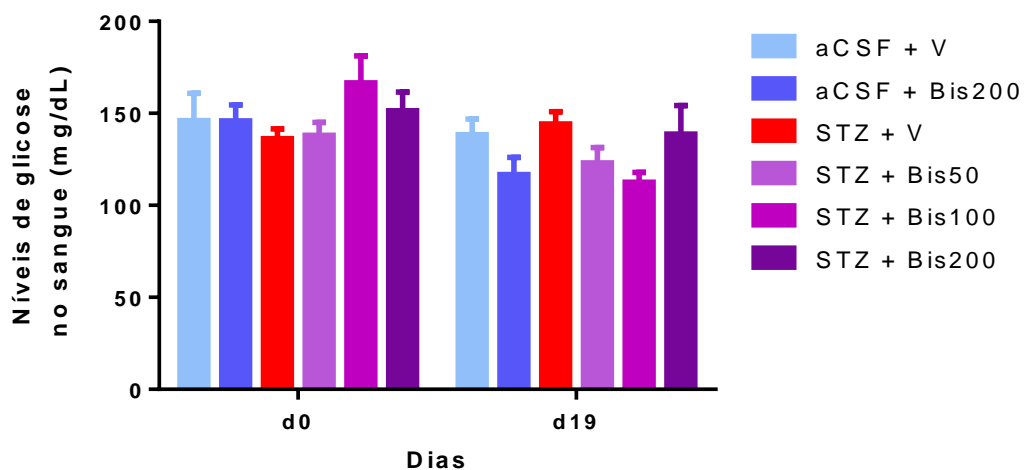
6.1 Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

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 o α -bisabolol, demonstrando que os animais não estavam diabéticos (Tabela 3). A Figura 14 mostra que os níveis de glicose não foram alterados em nenhum dos grupos experimentais avaliados neste estudo.

Tabela 3 - Níveis de glicose no sangue periférico em camundongos antes e após 19 dias.

| Grupos | Níveis de glicose no sangue (mg/dL) | |
|----------------|-------------------------------------|---------------|
| | d0 | d19 |
| aCSF + V | 146,1 ± 14,77 | 138,4 ± 8,52 |
| aCSF + BIS 200 | 145,9 ± 8,77 | 116,8 ± 9,37 |
| STZ +V | 136,2 ± 5,30 | 144,3 ± 6,70 |
| STZ + BIS 50 | 138,0 ± 7,16 | 123,0 ± 8,36 |
| STZ + BIS 100 | 166,5 ± 14,80 | 112,5 ± 5,37 |
| STZ + BIS 200 | 151,4 ± 10,06 | 138,7 ± 15,57 |

Figura 14 – Efeito do tratamento com o α -bisabolol sobre a glicemia em camundongos submetidos ao modelo de DAE por STZ



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias. A análise dos níveis de glicose no sangue dos camundongos (n = 8 - 10 animais/grupo) foi feita nos dias 0º e 19º, antes dos procedimentos de indução e imediatamente antes do sacrifício dos animais utilizando fitas de glicemia. Os valores estão representados como média ± EPM. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

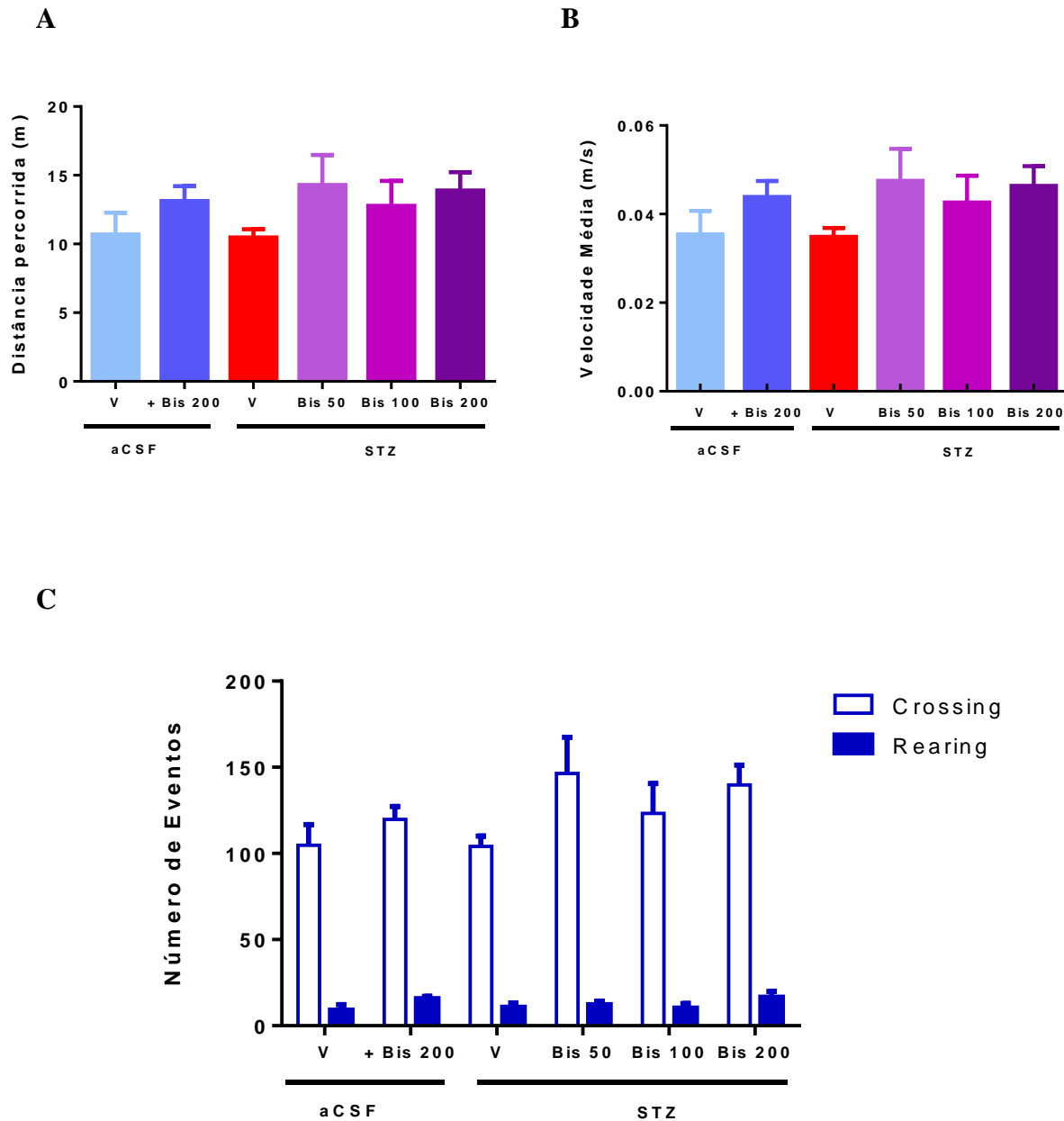
6. 2 Efeitos do α -bisabolol sobre a atividade locomotora (Teste do Campo aberto) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

Os resultados obtidos no teste do campo aberto demonstraram que não houve nenhuma alteração significativa entre os grupos em relação à distância percorrida (FIGURA 15A), velocidade média (FIGURA 15B) e no número de *crossings* e *rearings* (FIGURA 15C) (Tabela 4).

Tabela 4 - O efeito do tratamento com o α -bisabolol (50, 100 e 200 mg/kg v.o.) na distância percorrida, velocidade média e no número de *crossings* e *rearings*, registrados por meio do software ANY-maze (versão 4, USA), em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ no teste do campo aberto.

| Grupos | Distância percorrida | Velocidade média | <i>Crossings</i> | <i>Rearings</i> |
|----------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| aCSF + V | 10,70 \pm 1,58 | 0,035 \pm 0,0053 | 104,7 \pm 12,10 | 9,000 \pm 3,24 |
| aCSF + BIS 200 | 13,12 \pm 1,08 | 0,044 \pm 0,0036 | 119,8 \pm 7,42 | 15,67 \pm 1,33 |
| STZ + V | 10,48 \pm 0,59 | 0,035 \pm 0,002 | 104,0 \pm 6,09 | 10,78 \pm 2,42 |
| STZ + BIS 50 | 14,29 \pm 2,19 | 0,047 \pm 0,007 | 146,4 \pm 21,08 | 12,25 \pm 2,03 |
| STZ + BIS 100 | 12,77 \pm 1,83 | 0,043 \pm 0,006 | 123,3 \pm 17,28 | 10,25 \pm 2,61 |
| STZ + BIS 200 | 13,89 \pm 1,34 | 0,047 \pm 0,004 | 139,8 \pm 11,48 | 16,50 \pm 3,44 |

Figura 15 – Efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) na atividade locomotora de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ no teste do campo aberto.

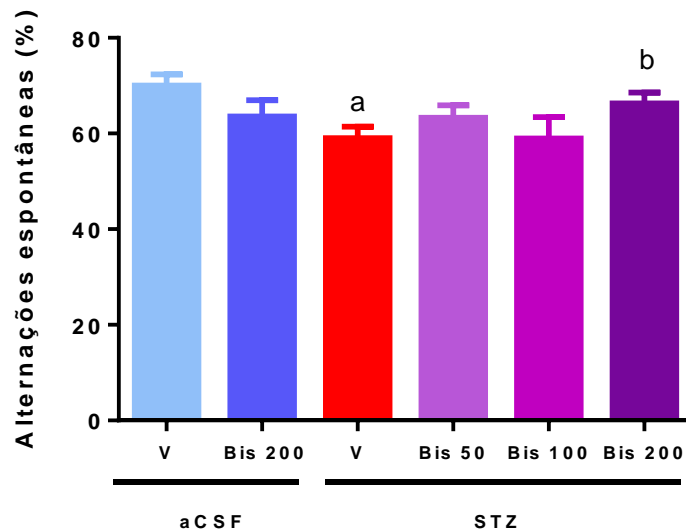


Os animais ($n = 8 - 10$ animais/grupo) foram tratados com α -bisabolol (50, 100 e 200 mg/kg v.o.) durante 16 dias, sendo a distância percorrida (A), velocidade média (B) e o número de *crossings* e *rearings* (C) avaliados pelo software ANYmaze (Stoelting Co., USA) por 5 minutos, 12 dias após a injeção de STZ. Os valores estão representados como média \pm EPM. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

6. 3 Efeitos do α -bisabolol sobre o déficit na memória de trabalho (Teste do Labirinto em Y) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

Na avaliação da memória de trabalho através do teste do labirinto em Y, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits significativos na porcentagem de alternâncias espontâneas (aCSF: $70,03 \pm 2,359$; STZ: $59,03 \pm 2,404$, $P < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo aCSF. O α -bisabolol na dose de 200 mg/kg protegeu os animais contra os déficits de memória de trabalho (STZ + BIS 200: $66,32 \pm 2,226$, $P < 0,05$) (FIGURA 16).

Figura 16 – Efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a memória de trabalho em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.



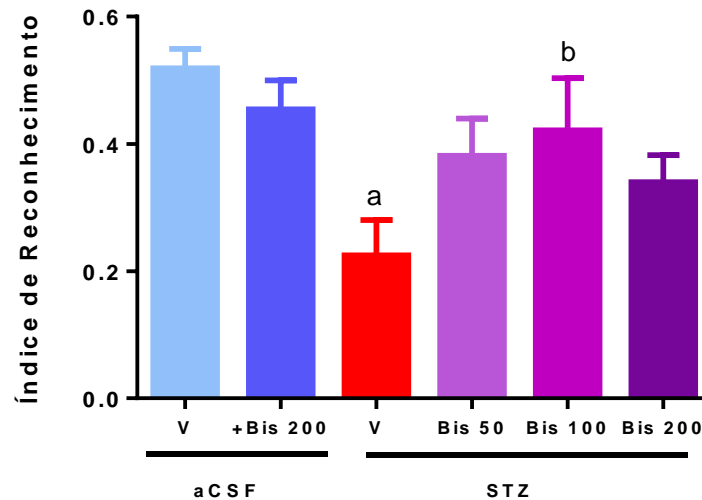
Os animais foram tratados com α -bisabolol (50, 100 e 200 mg/kg v.o.) durante 16 dias, sendo o número de alternações espontâneas contados durante 8 minutos, 12 dias após a injeção de STZ ($n = 8 - 12$ animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^a $P < 0,05$ vs aCSF. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. ^b $P < 0,01$ vs STZ. Teste T. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

6. 4 Efeitos do α -bisabolol sobre o déficit na memória de reconhecimento (Teste de Reconhecimento de Objetos) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

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 (aCSF: $0,52 \pm 0,03$; STZ: $0,26 \pm 0,06$, $P < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo aCSF, apresentando menor índice de reconhecimento. O

tratamento com o α -bisabolol promoveu uma melhora no índice de reconhecimento do objeto, no entanto só houve melhora significativa com a dose de 100 mg/kg (STZ + BIS 50: $0,38 \pm 0,058$; STZ + BIS 100: $0,42 \pm 0,08$; STZ + BIS 200: $0,34 \pm 0,04$, $P < 0,05$) (FIGURA 17).

Figura 17 – Efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg, v.o.) sobre a memória de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.



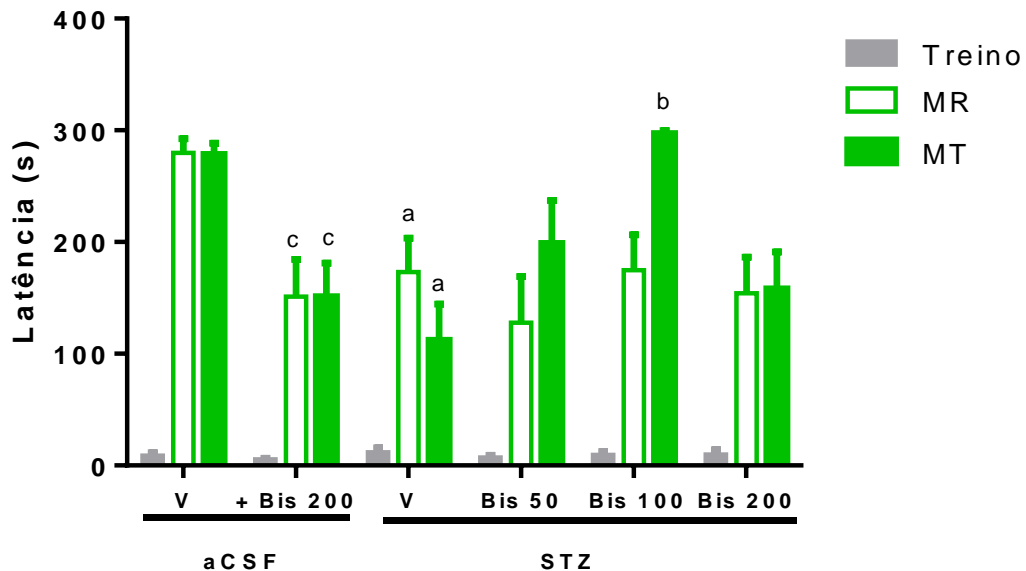
Os animais foram tratados com α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg, v.o.) durante 16 dias, sendo o índice de reconhecimento analisado 13 dias após a injeção de STZ, 1 h após a apresentação dos objetos ($n = 8 - 12$ animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^a $P < 0,01$ vs aCSF, ^b $P < 0,05$ vs STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

6. 5 Efeitos do α -bisabolol sobre a memória aversiva (Teste da Esquiva Passiva) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

Na avaliação da memória aversiva através do teste da esquiva passiva, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits na retenção da memória recente (MR) (latência, aCSF: $279,7 \pm 12,91$; STZ: $173,3 \pm 30,27$, $P < 0,05$) e na memória tardia (MT) (latência, aCSF: $278,6 \pm 10,04$; STZ: $112,1 \pm 32,47$, $P < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo aCSF. Este déficit foi protegido pelo tratamento com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg apenas na memória tardia (MT: STZ + BIS 100: $297,2 \pm 2,78$, $P < 0,05$). Os animais do grupo aCSF tratados com o α -bisabolol na dose de 200 mg/kg apresentaram déficits na retenção da memória recente (MR) (aCSF: $279,7 \pm 12,91$; aCSF + BIS 200: $151,2 \pm 33,14$, $P < 0,05$) e na memória tardia (MT) (aCSF: $278,6 \pm 10,04$; aCSF + BIS 200: $151,0 \pm$

30,21, $P < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo aCSF. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos nas latências dos animais no treino (FIGURA 18).

Figura 18 – Efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 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 α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg, v.o.) durante 16 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, 14 e 15 dias, respectivamente, após a injeção de STZ ($n = 8 - 12$ animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. Na memória recente: ^c $P < 0,01$ vs. aCSF, ^a $P < 0,05$ vs. aCSF. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. Na memória tardia: ^c $P < 0,01$ vs. aCSF, ^a $P < 0,01$ vs. aCSF, ^b $P < 0,001$ vs. STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. MR (Memória Recente); MT (Memória Tardia); aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

6. 6 Efeitos do α -bisabolol sobre o déficit na memória espacial (Teste do Labirinto Aquático) em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

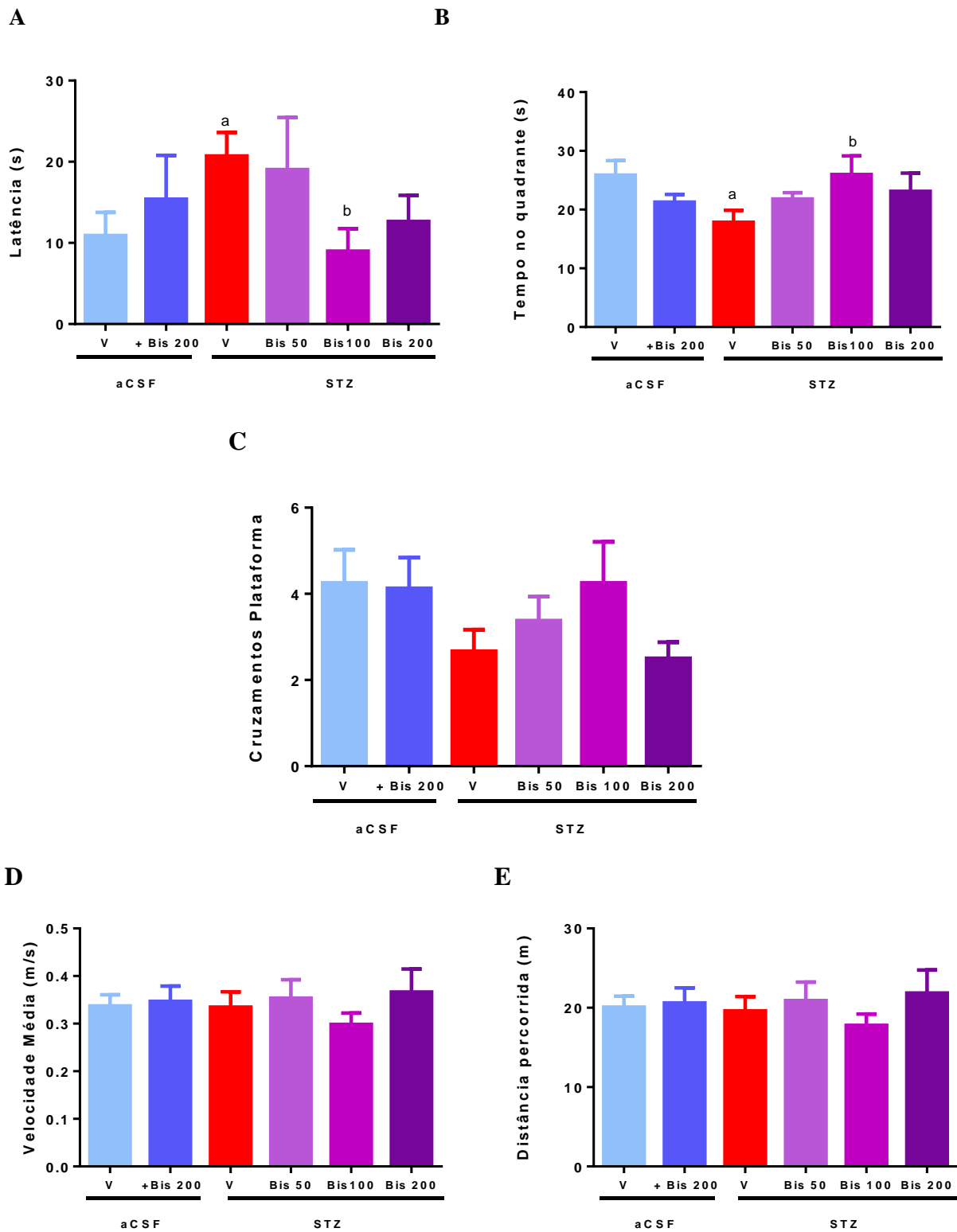
Na avaliação do aprendizado espacial através do labirinto aquático, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram déficits na memória espacial (tempo de latência em segundos, aCSF: $10,91 \pm 2,85$; STZ: $20,71 \pm 2,90$, $P < 0,05$), demonstrando um maior tempo de latência para encontrar a plataforma quando comparados aos animais do grupo aCSF. O tratamento com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg promoveu uma melhora significativa no tempo de latência para encontrar o local da plataforma (tempo de latência em segundos, STZ + BIS 50: $19,03 \pm 6,42$; STZ + BIS 100: $8,99 \pm 2,76$; STZ + BIS 200: $12,63 \pm 3,23$, $P < 0,05$) (FIGURA 19A).

Com relação ao tempo de permanência no quadrante, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram uma diminuição no tempo de permanência (tempo de permanência em segundos, aCSF: $25,87 \pm 2,487$; STZ: $17,86 \pm 2,040$, $P < 0,05$) (FIGURA 19B). O tratamento com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg promoveu um aumento significativo no tempo de permanência no quadrante (STZ + BIS 100: $25,99 \pm 3,15$, $P < 0,05$). Quanto ao número de cruzamentos no local da plataforma, não houve diferenças significativas entre os grupos, embora os animais tratados com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg apresentaram o mesmo número de cruzamentos que os animais controle (número de cruzamentos, aCSF: $4,25 \pm 0,77$; aCSF + BIS 200: $4,13 \pm 0,72$; STZ: $2,67 \pm 0,50$; STZ + BIS 50: $3,37 \pm 0,56$; STZ + BIS 100: $4,25 \pm 0,96$; STZ + BIS 200: $2,50 \pm 0,38$, $P < 0,05$) (FIGURA 19C).

Com relação à distância percorrida pelos animais até chegarem à plataforma, não houve diferenças estatísticas entre os grupos (distância percorrida em metros, aCSF: $20,08 \pm 1,39$; aCSF + BIS 200: $20,61 \pm 1,90$; STZ: $19,60 \pm 1,80$; STZ + BIS 50: $20,92 \pm 2,30$; STZ + BIS 100: $17,79 \pm 1,41$; STZ + BIS 200: $21,85 \pm 2,92$, $P < 0,05$) (FIGURA 19D).

Com relação à velocidade média dos animais, não houve diferenças estatísticas entre os grupos (velocidade média em m/s, aCSF: $0,34 \pm 0,024$; aCSF + BIS 200: $0,35 \pm 0,03$; STZ: $0,33 \pm 0,032$; STZ + BIS 50: $0,35 \pm 0,04$; STZ + BIS 100: $0,30 \pm 0,02$; STZ + BIS 200: $0,37 \pm 0,05$, $P < 0,05$) (FIGURA 19E).

Figura 19 – Efeito do α -bisabolol sobre a memória espacial em camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.



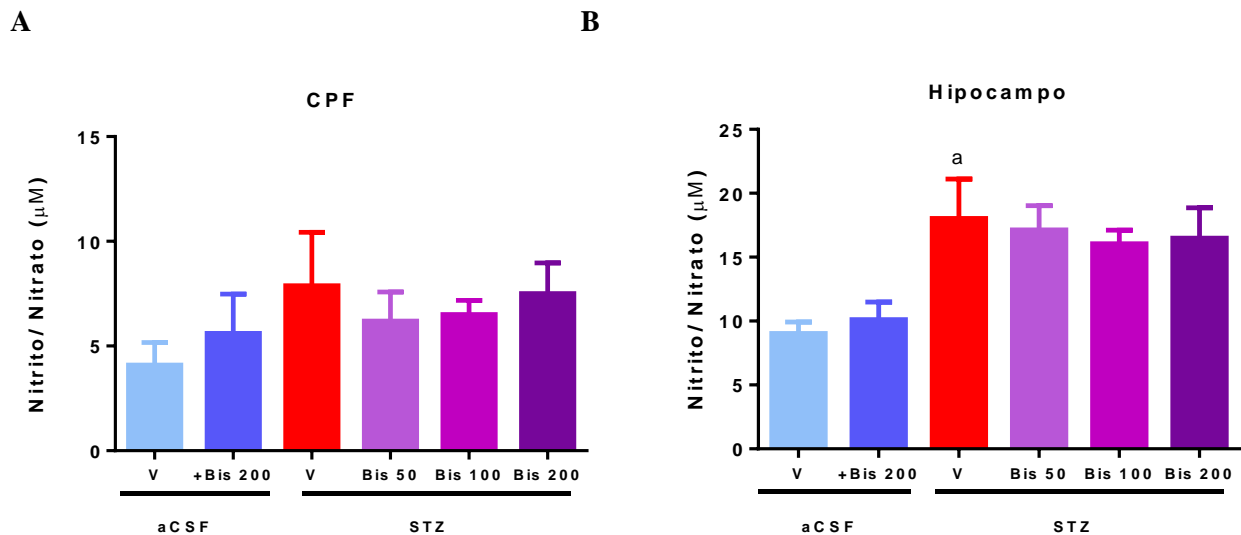
Os animais ($n = 8 - 10$ animais/grupo) foram tratados com α -bisabolol (50, 100 e 200 mg/kg v.o.) durante 16 dias, sendo a latência (A), tempo no quadrante (B), o número de cruzamentos na plataforma (C), velocidade média (D) e distância percorrida (E) avaliados pelo software ANYmaze (Stoelting Co., USA) durante 1 minuto, no 18º dia após a injeção de STZ. Os valores estão representados como média \pm EPM. A) ^aP < 0,05 vs aCSF, ^bP < 0,05 vs STZ, Teste T, P < 0,05. B) ^aP < 0,05 vs. aCSF, ^bP < 0,05 vs STZ. ANOVA de uma via, seguido de

Teste de Bonferroni, $P < 0,05$. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

6. 7 Efeitos do α -bisabolol sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

Na avaliação da dosagem de nitrito/nitrato nos tecidos cerebrais, córtex pré-frontal e hipocampo, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram um aumento nas concentrações de nitrito, porém esse aumento só foi significativo no hipocampo (concentração em μM , aCSF: $9,026 \pm 0,8943$; STZ: $18,04 \pm 3,076$, $P < 0,05$) (FIGURA 21A e B). O tratamento com o α -bisabolol não foi capaz de diminuir o aumento da concentração de nitrito em ambas as áreas cerebrais (FIGURA 20A e B).

Figura 20 – Efeitos do α -bisabolol sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

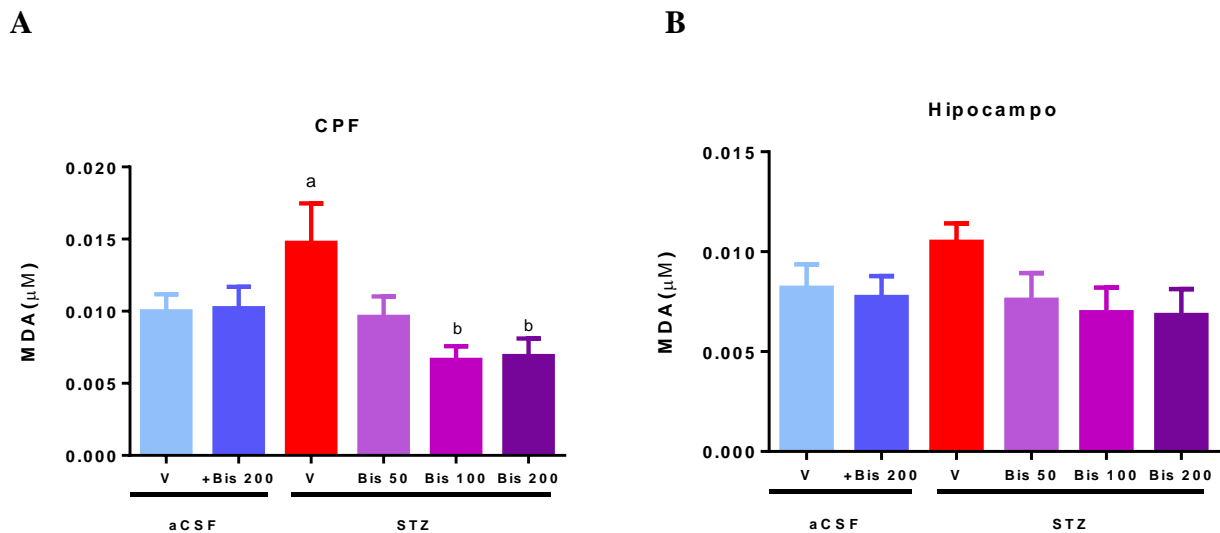


Os animais foram tratados com α -bisabolol (50, 100 e 200 mg/kg v.o.) durante 16 dias, sendo as áreas dissecadas para dosagem de nitrito/nitrato em μM 16 dias após a injeção de STZ ($n = 6$ animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. B) ^a $P < 0,05$ vs. aCSF. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni, $P < 0,05$. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

6. 8 Efeitos do α -bisabolol sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

Na avaliação da dosagem de MDA, córtex pré-frontal e hipocampo, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram um aumento nas concentrações de MDA, porém esse aumento só foi significativo no córtex pré-frontal (concentrações de MDA em μM , aCSF: $0,010 \pm 0,0012$; STZ: $0,015 \pm 0,003$, $P < 0,05$ (FIGURA 21 A). O tratamento com o α -bisabolol nas doses de 100 ou 200 mg/kg foi capaz de diminuir o aumento da concentração de MDA apenas no córtex pré frontal (concentrações de MDA em μM , STZ+BIS 50: $0,0096 \pm 0,00142$; STZ+BIS 100: $0,0067 \pm 0,00096$; STZ+BIS 200: $0,007 \pm 0,0012$) (FIGURA 21 B).

Figura 21 – Efeitos do α -bisabolol sobre a peroxidação lipídica (TBARS) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo as áreas dissecadas para dosagem de MDA em μM 16 dias após a injeção de STZ ($n = 6$ animais/grupo). Os valores estão representados como média \pm EPM. A) ^a $P < 0,05$ vs. CSF, ^b $P < 0,01$ vs. STZ, ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

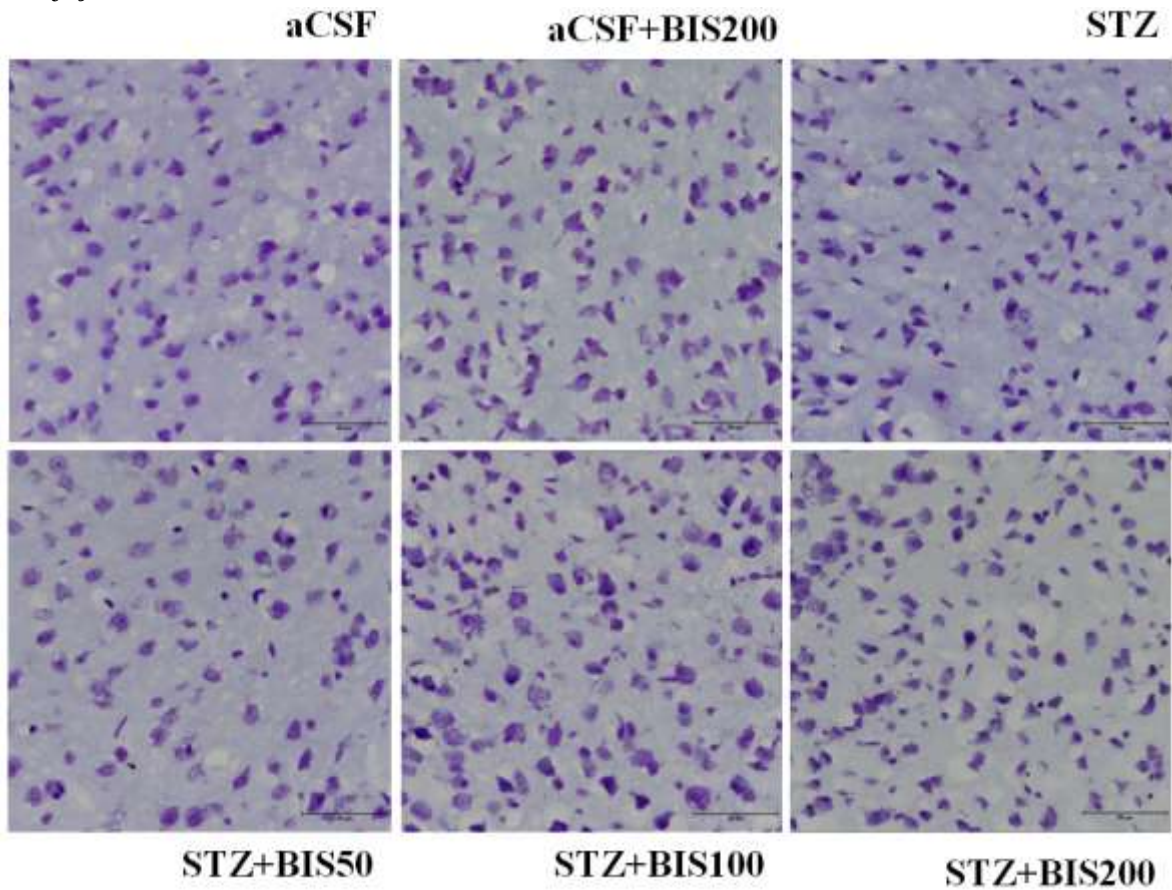
6. 9 Efeitos do α -bisabolol sobre a integridade neuronal evidenciada através da coloração com o Cresil violeta no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ.

Na avaliação da integridade neuronal através da coloração com o Cresil violeta, não foi evidenciada morte neuronal no córtex pré-frontal de animais submetidos às injeções de STZ (FIGURA 22) (número de células viáveis, aCSF: $82,92 \pm 3,709$; aCSF + Bis 200: $86,63 \pm 6,467$:STZ: $80,28 \pm 2,771$) (FIGURA 23). O tratamento com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente o número de células viáveis no córtex pré-frontal em comparação com o grupo de animais submetidos as injeções de STZ (número de células viáveis, STZ+BIS 100: $105,5 \pm 3,420$, $P < 0,01$) (FIGURA 23).

Foi observado um menor numero de células viáveis nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo de animais submetidos às injeções de STZ (FIGURA 24) (número de células viáveis, CA1- aCSF: $128,4 \pm 5,343$; STZ: $96,75 \pm 6,909$, $P < 0,05$; CA3 - aCSF: $196,2 \pm 10,17$; STZ: $105,3 \pm 3,669$, $P < 0,05$) (FIGURA 25 e 26), não havendo uma diminuição das células viáveis na região do GD (número de células viáveis, aCSF: $290,8 \pm 18,28$; STZ: $275,3 \pm 17,63$, $P < 0,05$) (FIGURA 27).

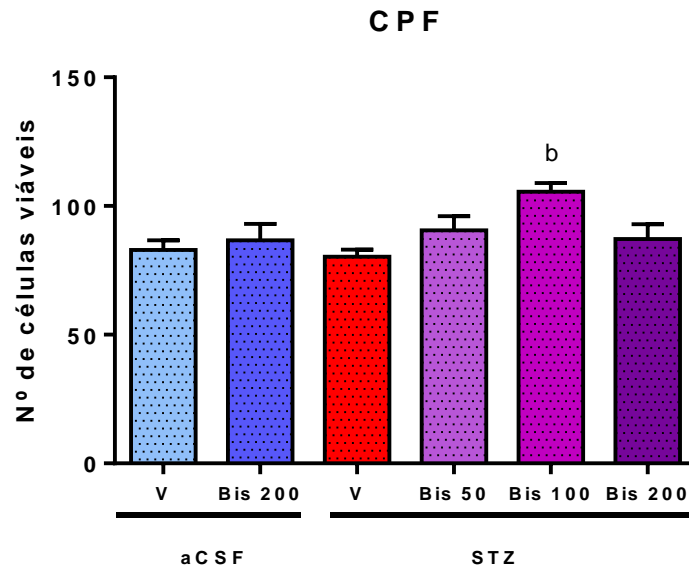
Na região do CA1, o tratamento com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente a morte neuronal (número de células viáveis, STZ+BIS 100: $128,4 \pm 4,257$, $P < 0,05$) (FIGURA 25), havendo um aumento significativo do número de neurônios viáveis nessa região. Na região do CA3, o tratamento com o α -bisabolol foi capaz de diminuir a morte neuronal nas três doses, de 50, 100 e 200 mg/kg (número de células viáveis, STZ+BIS 50: $162,8 \pm 13,46$; STZ+BIS 100: $163,6 \pm 13,34$; STZ+BIS 200: $146,3 \pm 6,767$, $P < 0,05$) (FIGURA 26).

Figura 22 - Fotomicrografias (Violeta de Cresil), aumento 200x, representativas do efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a viabilidade celular no córtex pré-frontal de camundongos após as injeções de STZ.



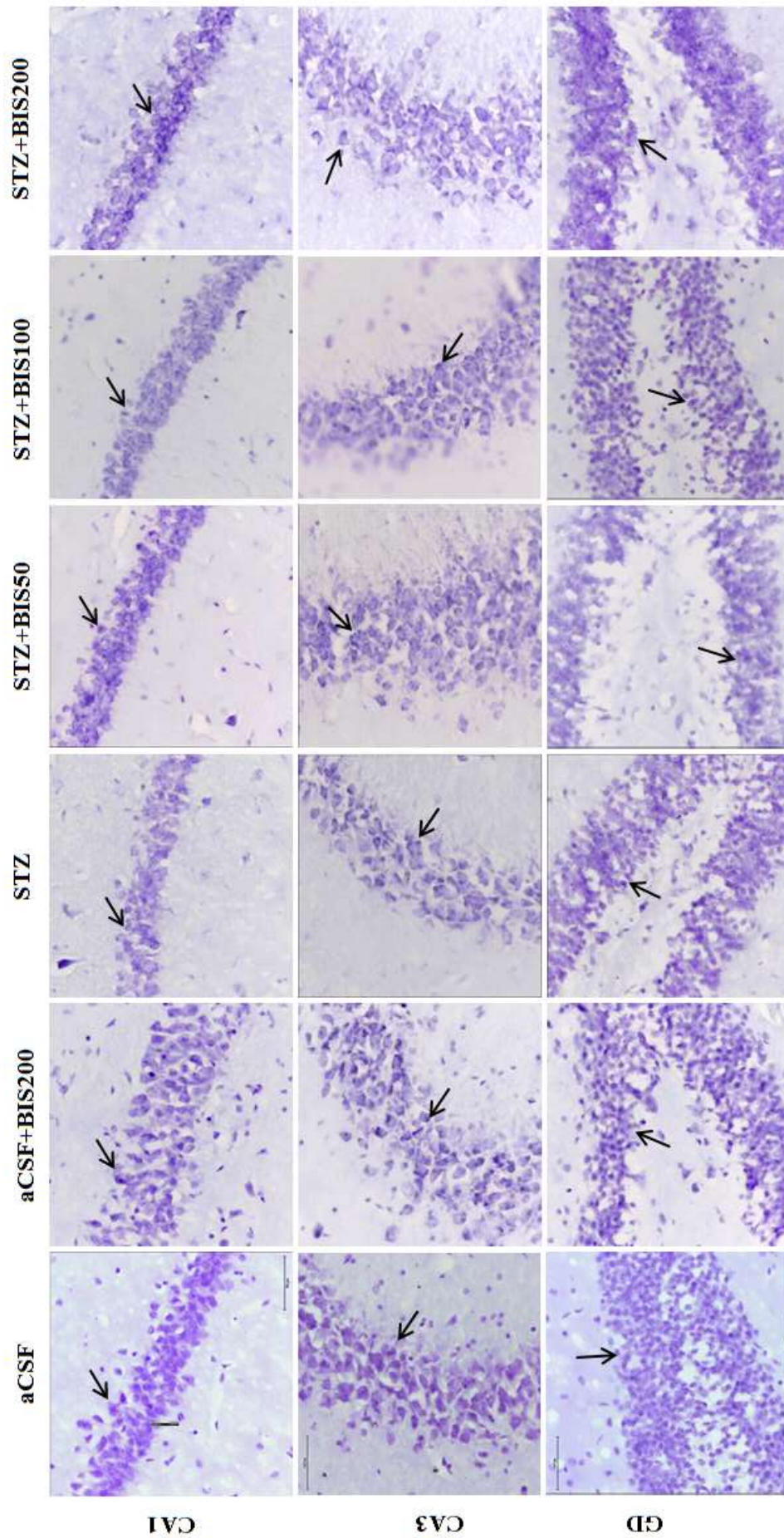
Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil Vvioleta 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal). aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x.

Figura 23- Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no córtex pré-frontal de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ



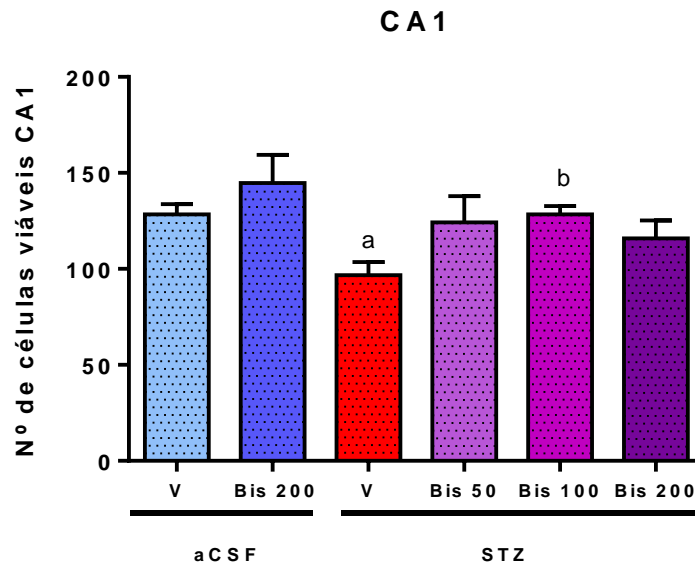
Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil violeta 16 dias após a injeção de STZ ($n = 4$ animais/grupo, 3 fatias/animal). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^b $P < 0,01$ vs. STZ, ANOVA de uma via, seguido do Teste Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

Figura 24 - Fotomicrografias (Violeta de Cresil), aumento 200x, representativas do efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a viabilidade celular no hipocampo de camundongos após as injeções de STZ



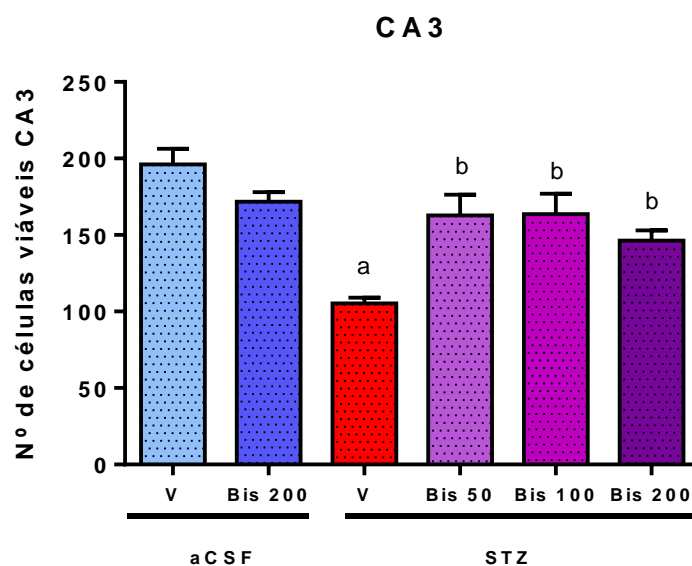
Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil violeta 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal). aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol). Visualização: microscópio Nikon Elipse E200, com aumento de 200x.

Figura 25 - Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o cresil violeta no hipocampo na região CA1 de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil violeta 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^aP < 0,05 vs. CSF, ^bP < 0,01 vs. STZ, ANOVA de uma via, seguido do Teste T. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

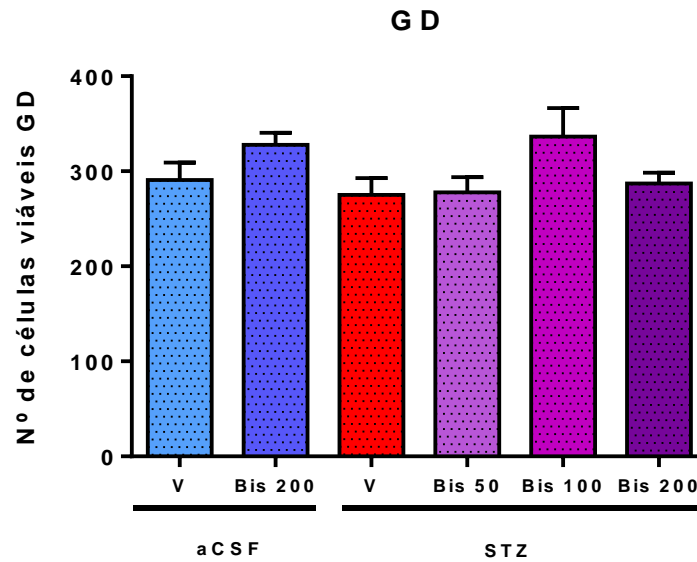
Figura 26- Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no hipocampo na região CA3 de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil violeta 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal).

Os valores estão representados como média \pm EPM. ^aP < 0,01 vs. aCSF, ^bP < 0,05 vs. STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

Figura 27- Avaliação da viabilidade celular através da coloração com o Cresil violeta no hipocampo na região do Giro Denteado (GD) de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Cresil violeta 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal). Os valores estão representados como média \pm EPM. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

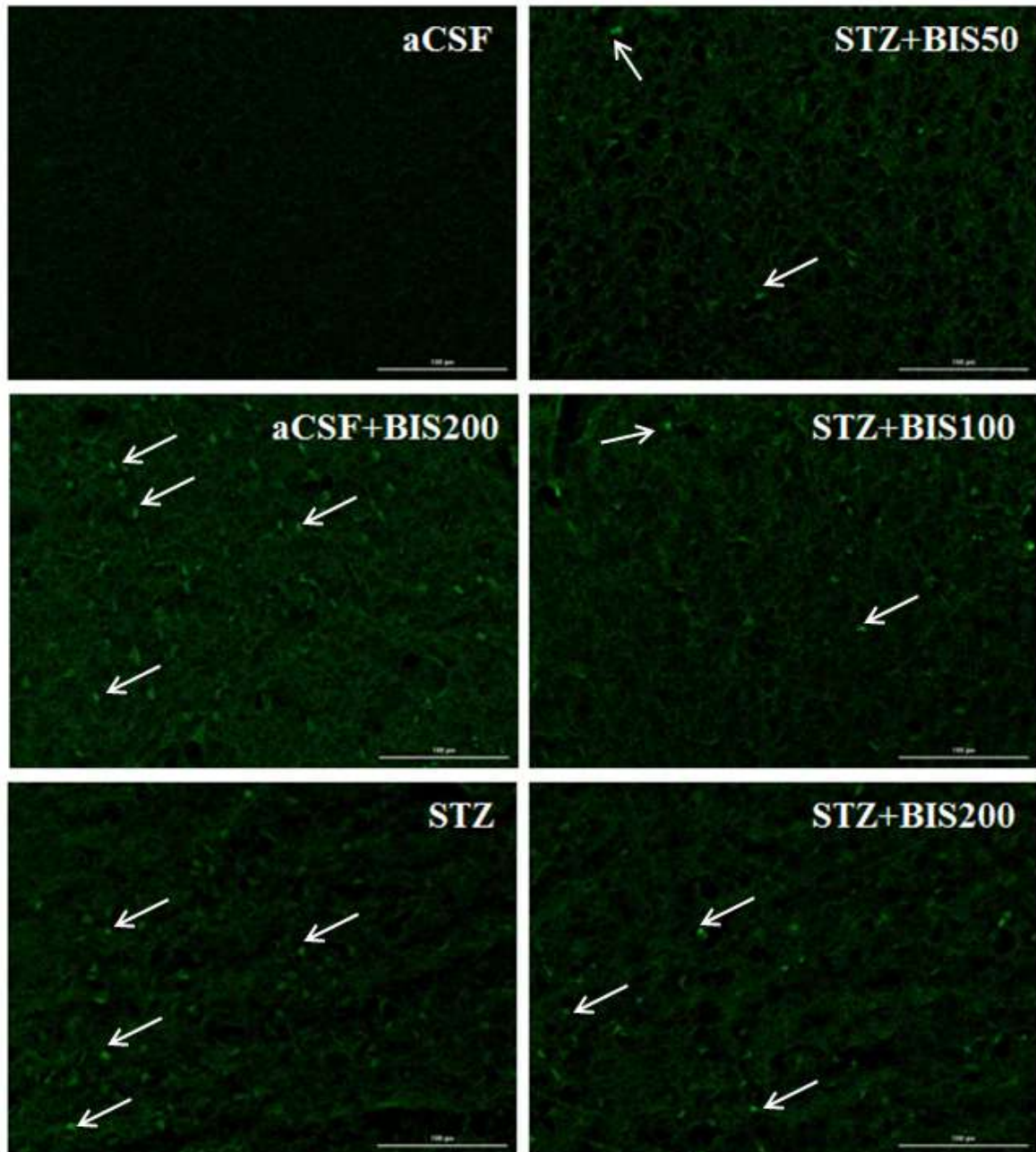
6. 10 Efeitos do α -bisabolol sobre a degeneração neuronal evidenciada através da coloração com Fluoro Jade C no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ

Na avaliação da degeneração neuronal, através da coloração com Fluoro Jade C, foi evidenciado um maior número de células positivas no córtex pré-frontal (número de células positivas no CPF, aCSF: $5,278 \pm 0,9134$; aCSF + Bis 200: $20,61 \pm 16,94$; STZ: $28,08 \pm 3,428$, $P < 0,01$) (FIGURA 28 e 29), na região CA3 do hipocampo (número de células positivas no hipocampo – CA3, aCSF: $5,583 \pm 1,530$; aCSF + Bis 200: $19,33 \pm 4,333$; STZ: $14,56 \pm 0,6186$, $P < 0,05$) (FIGURA 33) e na região do Giro Denteado (GD) do hipocampo (número de células positivas no hipocampo - GD, aCSF: $10,50 \pm 1,868$; aCSF + Bis 200: $23,50 \pm 5,167$; STZ: $23,33 \pm 2,681$, $P < 0,05$) (FIGURA 34) de animais submetidos às injeções de STZ, representando maior degeneração neuronal.

Nos animais controles, que receberam injeções de aCSF, o tratamento com o α -bisabolol na dose de 200 mg/kg promoveu um aumento significativo do número de células positivas nas regiões CA3 (número de células positivas no hipocampo – CA3, aCSF: $5,583 \pm 1,530$; aCSF + Bis 200: $19,33 \pm 4,333$; $P < 0,01$) e GD (número de células positivas no hipocampo - GD, aCSF: $10,50 \pm 1,868$; aCSF + Bis 200: $23,50 \pm 5,167$, $P < 0,05$) do hipocampo, (FIGURA 33 e 34, respectivamente).

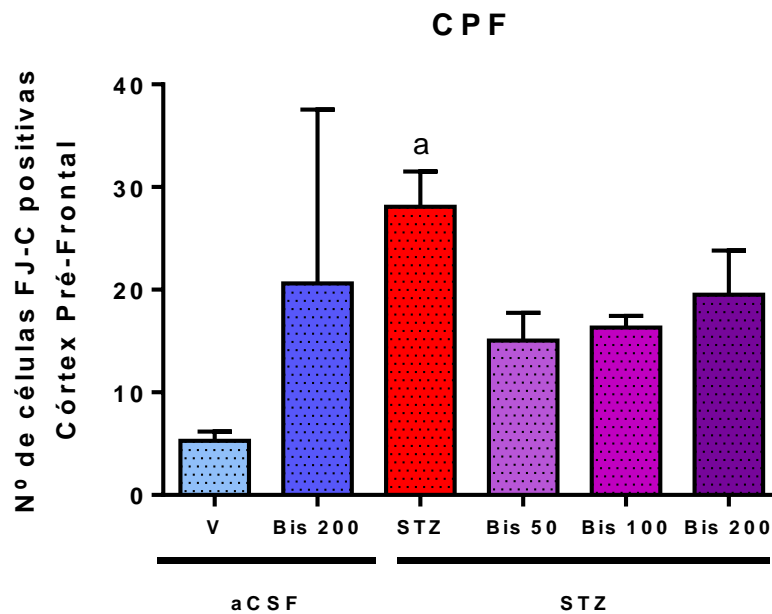
O tratamento com o α -bisabolol na dose de 50 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente o número de células positivas na região do CA3 (número de células positivas no hipocampo – CA3, STZ: $14,56 \pm 0,6186$; STZ+BIS 50: $5,417 \pm 1,702$, $P < 0,05$). E na dose de 200 mg/kg, o α -bisabolol foi capaz de diminuir significativamente o número de células positivas na região do CA3 (número de células positivas no hipocampo – CA3, STZ: $14,56 \pm 0,6186$; STZ+BIS 200: $4,778 \pm 2,837$, $P < 0,05$) e GD do hipocampo (número de células positivas no hipocampo – GD, STZ: $23,33 \pm 2,681$; STZ+BIS 200: $9,889 \pm 3,069$, $P < 0,05$) (FIGURA 30 e 31), demonstrando uma diminuição da degeneração neuronal.

Figura 28 - Fotomicrografias (coloração por Fluoro Jade C), aumento 200x, representativas do efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a degeneração neuronal no córtex pré-frontal de camundongos após as injeções de STZ



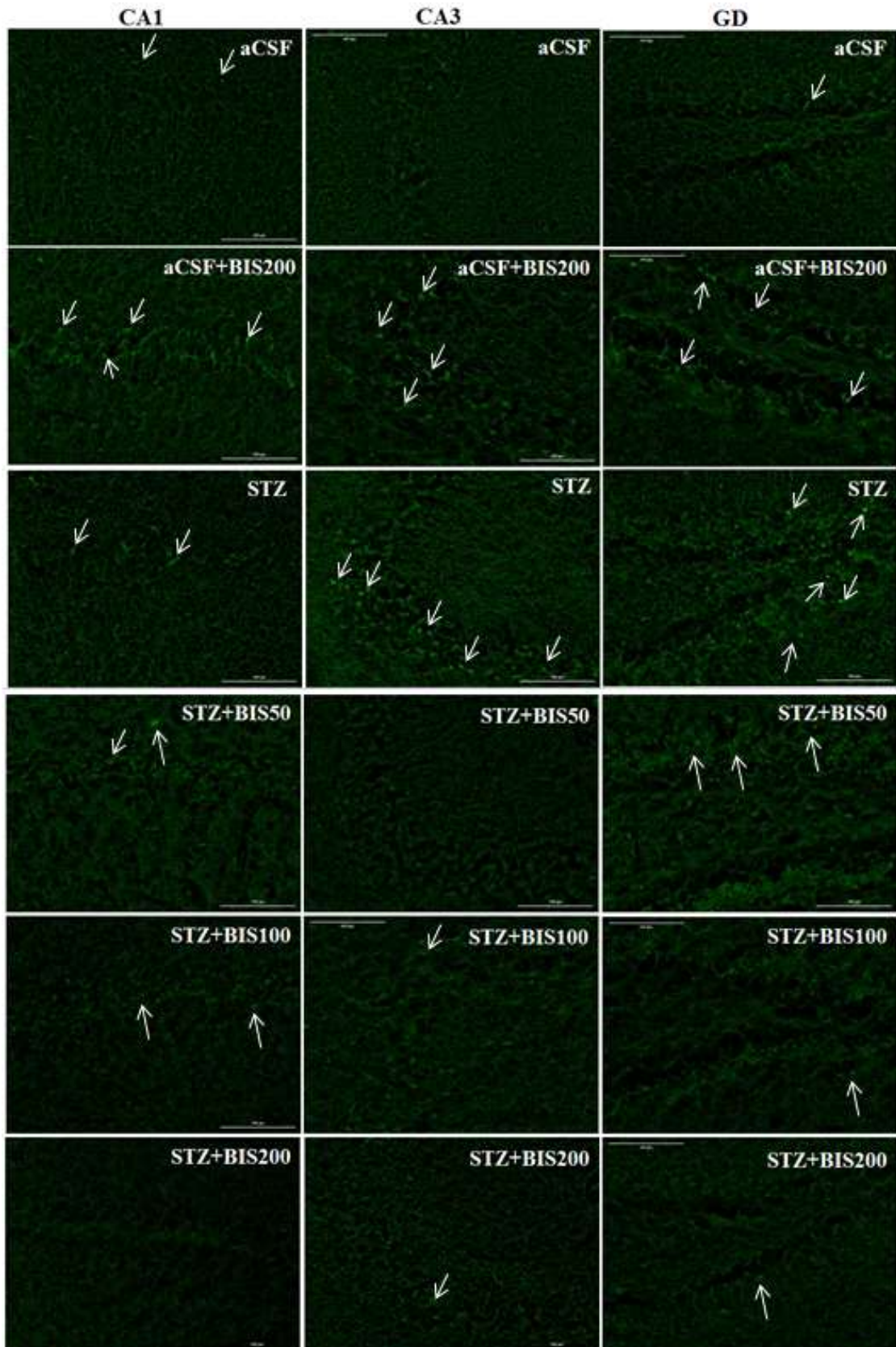
Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Fluoro Jade C 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal). aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol). Visualização: *Cytation*, com aumento de 200x.

Figura 29- Avaliação da degeneração neuronal através da coloração com o Fluoro Jade C no córtex pré-frontal de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Fluoro Jade C 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^aP < 0,01 vs. CSF, ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

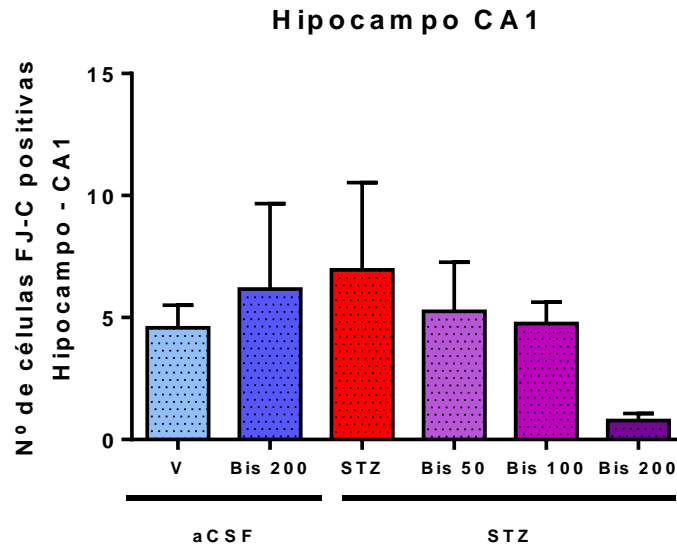
Figura 30 - Fotomicrografias (coloração por Fluoro Jade C), aumento 200x, representativas do efeito do α -bisabolol (50, 100, 200 mg/kg) sobre a degeneração neuronal no hipocampo de camundongos após as injeções de STZ



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Fluoro Jade C 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal).

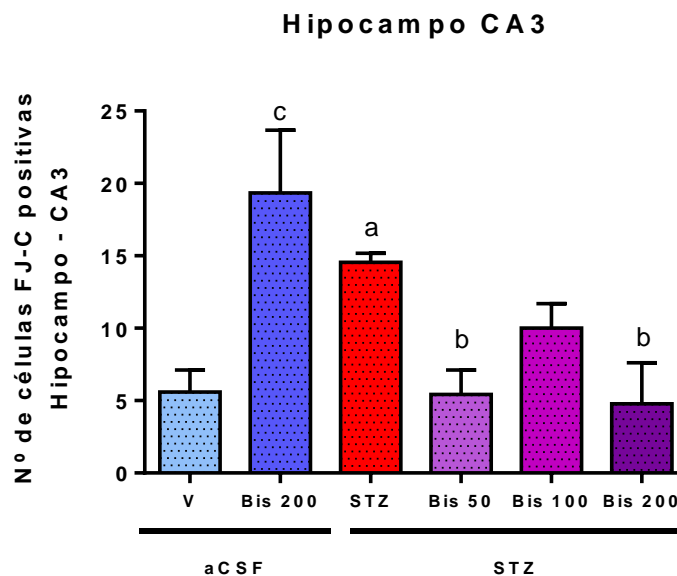
aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol). Visualização: *Cytation*, com aumento de 200x.

Figura 31- Avaliação da degeneração neuronal através da coloração com o Fluoro Jade C no hipocampo na região CA1 de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Fluoro Jade C 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal). Os valores estão representados como média \pm EPM. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

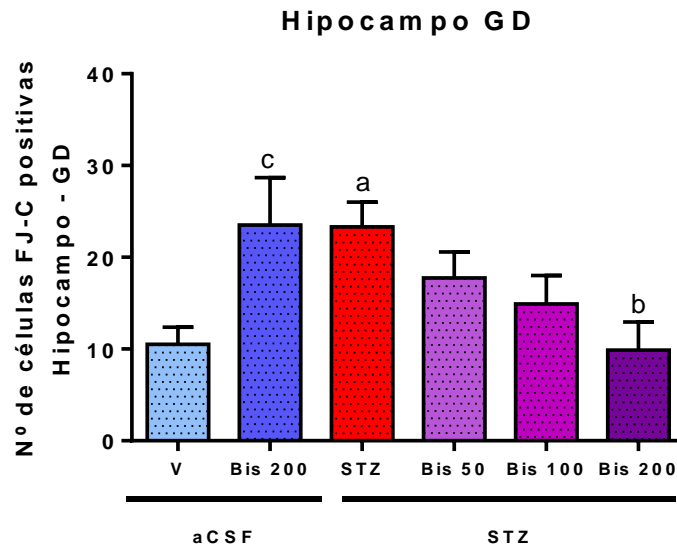
Figura 32- Avaliação da degeneração neuronal através da coloração com o Fluoro Jade C no hipocampo na região CA3 de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ.



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Fluoro Jade C 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 3 fatias/animal). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^aP < 0,01 vs. CSF, ^cP < 0,05 vs. CSF, ^bP < 0,05 vs. STZ.

ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

Figura 33- Avaliação da degeneração neuronal através da coloração com o Fluoro Jade C no hipocampo na região GD de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ

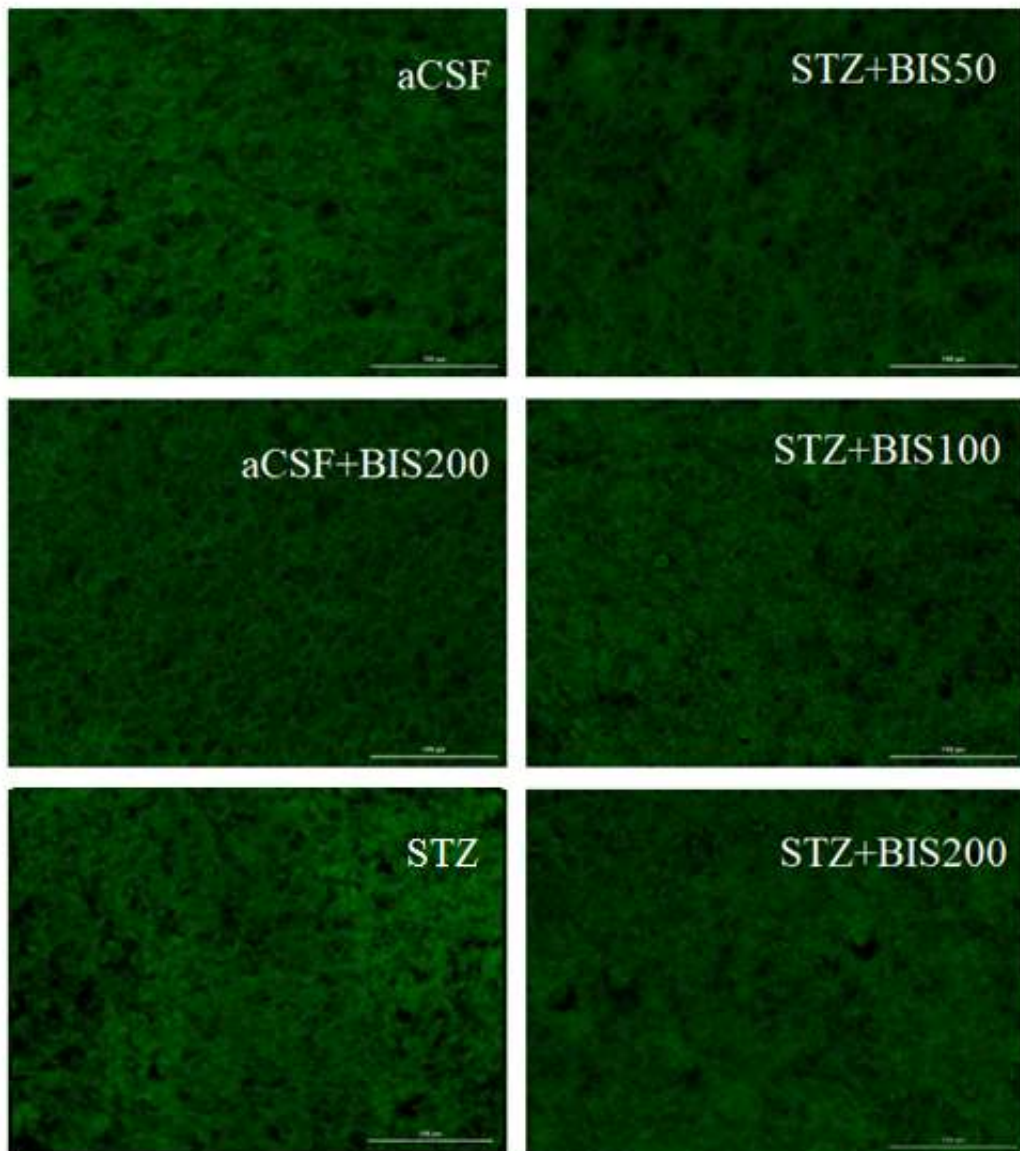


Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Fluoro Jade C 16 dias após a injeção de STZ ($n = 4$ animais/grupo, 3 fatias/animal). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^aP < 0,01 vs. CSF, ^cP < 0,05 vs. CSF, ^bP < 0,05 vs. STZ. ANOVA de uma via, seguido do Teste de Bonferroni. aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol).

6. 11 Efeitos do α -bisabolol sobre a formação de placas senis evidenciadas através da coloração com Tioflavina S no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DAE por injeção de STZ

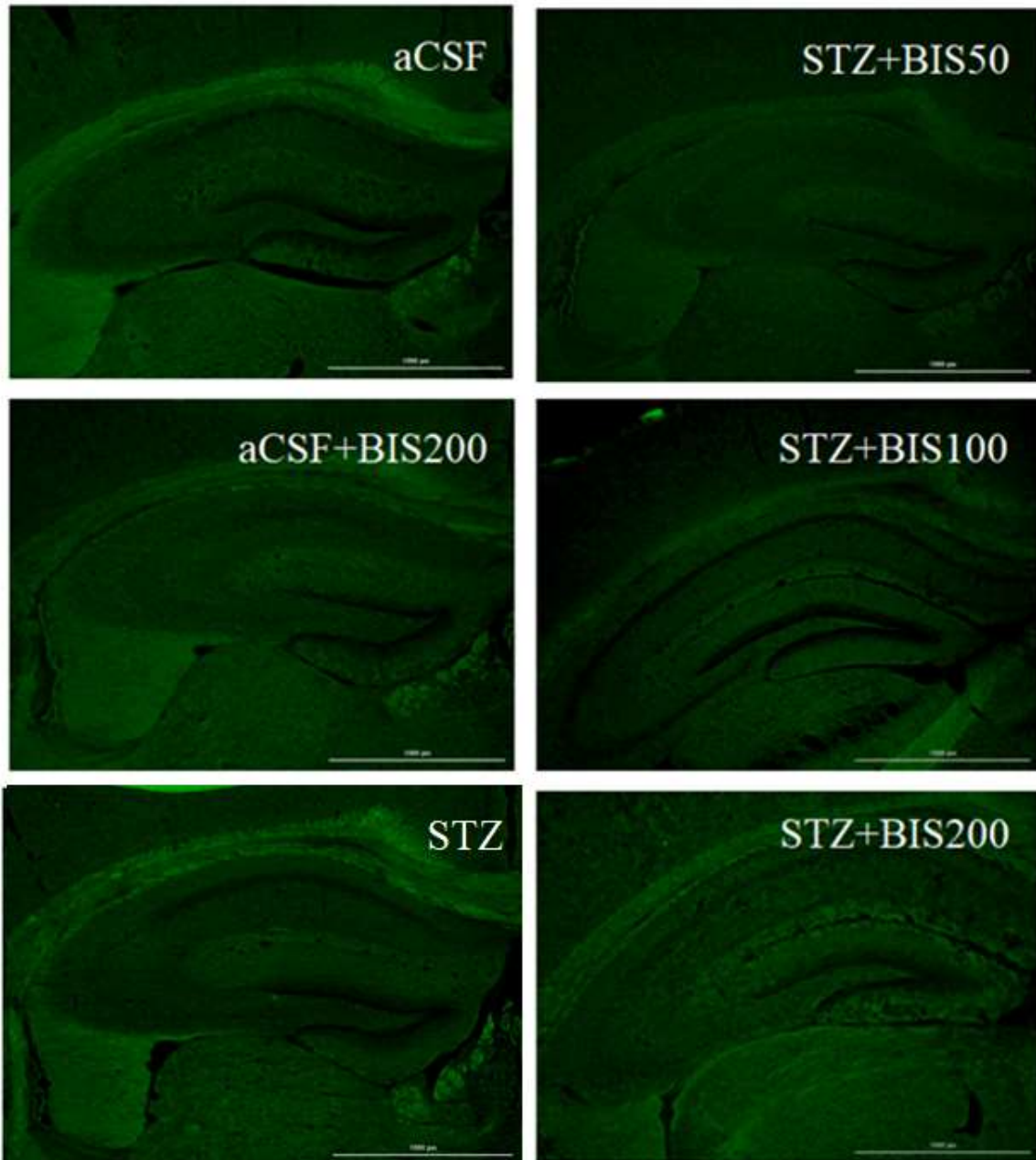
Não foi observada formação de placas senis na área do córtex pré-frontal e hipocampo, não sendo possível realizar a quantificação (FIGURA 34 e 35).

Figura 34 - Avaliação da formação de placas senis através da coloração com Tioflavina S, aumento 200x, no córtex pré-frontal de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ



Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Tioflavina S 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 6 fatias/animal). aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol). Visualização: *Cytation*, com aumento de 200x.

Figura 35 - Avaliação da formação de placas senis através da coloração com Tioflavina S, aumento 200x, no hipocampo de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ



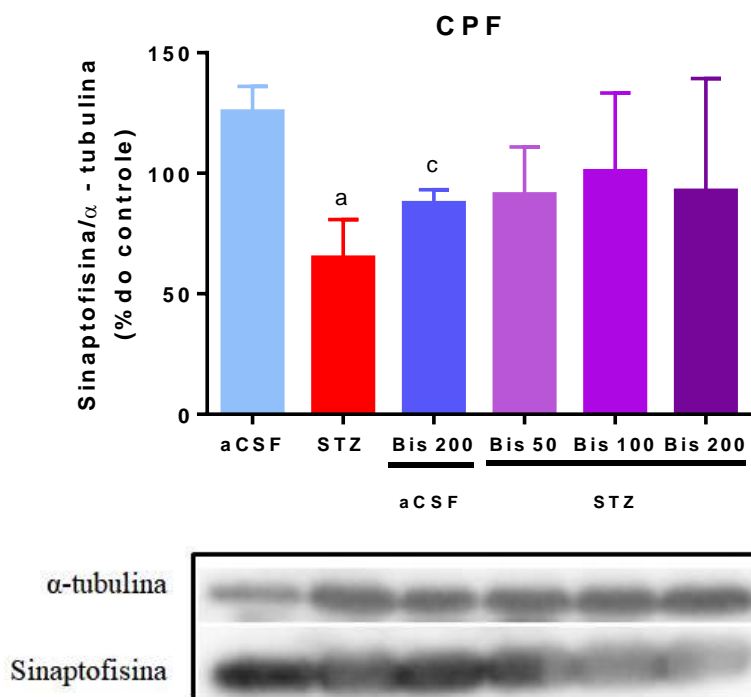
Os animais foram tratados com α -bisabolol v.o. durante 16 dias, sendo os cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com Tioflavina S 16 dias após a injeção de STZ (n = 4 animais/grupo, 6 fatias/animal). aCSF (artificial Fluido Cérebro Espinal); V (Veículo - tween 3% + salina v.o.); STZ (Streptozotocina); Bis (α -bisabolol). Visualização: *Cytation*, com aumento de 200x.

6. 12 Avaliação da expressão de sinaptofisina através da técnica de *Western-blot*

A análise por *Western blot* demonstrou que a expressão de sinaptofisina (37 kDa) diminuiu significativamente no córtex pré-frontal após as injeções de STZ (Relação sinaptofisina/ α – Tubulina, % do controle: aCSF: $125,8 \pm 10,20$; STZ: $65,23 \pm 15,53$, $P < 0,05$). Nos animais controles, que receberam injeções de aCSF, o tratamento com o α -bisabolol na dose de 200 mg/kg promoveu uma diminuição significativa na expressão da sinaptofisina (Relação sinaptofisina/ α – Tubulina, % do controle: aCSF: $125,8 \pm 10,20$; aCSF+BIS200: $87,87 \pm 5,378$, $P < 0,05$). Nos animais que receberam injeções de STZ, o tratamento com o α -bisabolol aumentou a expressão da sinaptofisina, mas não de forma significativa (FIGURA 30).

No hipocampo, também houve uma diminuição significativa da expressão de sinaptofisina após as injeções de STZ (Relação sinaptofisina/ α – Tubulina, % do controle: aCSF: $100,0 \pm 11,83$; aCSF+BIS200: $86,60 \pm 5,378$; STZ: $67,55 \pm 5,234$, $P < 0,05$). O tratamento com o α -bisabolol inibiu significativamente a diminuição da sinaptofisina nos animais que receberam as injeções de STZ (STZ+BIS 50: $88,48 \pm 10,51$; STZ+BIS 100: $106,2 \pm 14,19$; STZ+BIS 200: $113,7 \pm 16,54$, $P < 0,05$) (FIGURA 31).

Figura 36 - Expressão de sinaptofisina avaliada por *Western blotting* no córtex pré-frontal de camundongos tratados com α -bisabolol após as injeções de STZ



Análise densiométrica (gráfico em barras) e bandas reativas (em sequência: aCSF, STZ, aCSF+BIS200, STZ+BIS50, STZ+BIS100, STZ+BIS200, n = 4). A α -tubulina foi utilizada para normalização do sinal da

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, mostramos as alterações comportamentais e histoquímicas induzidas pela injeção 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, do labirinto em Y, de reconhecimento de objetos, da esquiwa passiva e do labirinto aquático de Morris. Os estudos bioquímicos demonstraram o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e os histológicos uma diminuição do número de neurônios viáveis nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo e um aumento na neurodegeneração no córtex pré-frontal e nas regiões CA3 e GD do hipocampo. Também foi observada uma diminuição significativa da sinaptofisina no córtex pré-frontal e hipocampo e o efeito neuroprotetor do α -bisabolol nesses parâmetros.

Entende-se que a DA é uma desordem neurológica ainda bastante incompreendida e suas múltiplas vias patológicas contribuem para a complexidade e dificuldade de tratamento e prevenção desta doença. Uma vez que ainda não há cura para a DA, o desafio maior está no desenvolvimento de novas terapias e/ou alvos terapêuticos para cura ou tratamento sintomático da doença.

O modelo de DAE induzido por STZ causa uma espécie de dessensibilização dos Receptores de Insulina (RI), alterando o funcionamento das enzimas envolvidas no metabolismo da glicose cerebral com consequentes alterações bioquímicas e fisiopatológicas semelhantes a algumas das alterações cerebrais observadas durante a DA (AGRAWAL *et al.*, 2011), como estresse oxidativo, neuroinflamação, perda neuronal e comprometimento do aprendizado e da memória (SALKOVIC-PETRISIC; HOYER, 2007; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013).

Alterações moleculares e comportamentais têm sugerido que a resistência à insulina no cérebro está presente, tanto no diabetes tipo 2 como na DAE, e que é uma característica tanto do mecanismo patogênico da doença quanto do quadro tardio da DAE, havendo um aumento do quadro de resistência conforme a patologia progride (STEEN *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2011).

A insulina possui importantes funções no cérebro, tendo ação neuroendócrina, neuroprotetora, neuromodulatória e seu receptor possui um papel fundamental na regulação gênica e na plasticidade sináptica em importantes regiões do cérebro (APOSTOLA-TOS *et al.*, 2012; CHIU; CHEN; CLINE, 2008). Sendo que tanto a insulina quanto os receptores de insulina podem ser encontrados em várias regiões do encéfalo associadas ao desempenho de

funções cognitivas - tais como o córtex cerebral e o hipocampo (WATSON; CRAFT, 2004; HOYER, 2002). Cascatas de sinalização ativadas por receptores de insulina são responsáveis por regular além do metabolismo energético, fatores de crescimento celular, sobrevivência neuronal, estresse oxidativo e expressão de genes de receptores colinérgicos (DE LA MONTE; WANDS, 2008).

Os defeitos mitocondriais aumentam com a idade e estão aumentados na DA. Tais defeitos apresentam-se sob a forma de danos em vários complexos da cadeia respiratória, aumento das espécies reativas de oxigênio e dano oxidativo das proteínas mitocondriais que, por sua vez, conduzem a um dano total na mitocôndria (FERRER, 2009). Um metabolismo energético enfraquecido resulta em produção deficiente de ATP e diminuição da capacidade de resposta a exigências energéticas, como estímulos fisiológicos a *inputs* sinápticos (FERRER, 2009; DE LA MONTE; TONG, 2014).

Uma importante consequência fisiopatológica do metabolismo alterado da glicose, gerada pela resistência à insulina, é a redução de aproximadamente 50% da produção de ATP no início da DAE e esta redução continua aumentando com a progressão da doença (SHAH; DESILVA; ABBRUSCATO, 2012). A deficiência energética gerada pela menor disponibilidade de ATP no cérebro desencadeia um processo de estresse oxidativo, como formação de ERO's e de espécies nitrogênio reativas, causando dano no DNA, causando disfunção neuronal e declínio progressivo, também pode ativar cascatas de sinalização que levam à perda de células nervosas, apoptose (DE LA MONTE; TONG, 2014).

Além da redução da ATP, o déficit de glicose no cérebro acarreta redução da produção da acetilcoenzima-A (Acetil-CoA) que, além de ser uma fonte de energia celular, é matéria prima para a produção da acetilcolina (HOYER, 2004). Desta forma, o sistema colinérgico também é afetado diretamente pela disfunção energética que ocorre na DA e pode ser um dos mecanismos biológicos para a redução da capacidade de memória e aprendizado na doença, visto que este sistema neurotransmissor está intimamente relacionado com processos cognitivos (DE LA MONTE; WANDS, 2008).

Os neurônios hipotalâmicos sensíveis à glicose estão localizados dentro da BHE. No entanto, *tanycytes*, um tipo particular de células gliais localizadas nos órgãos circumventriculares desprovidos de BHE (LANGLET *et al.*, 2013) são suspeitos de serem capazes de detectar o nível de glicose no sangue tanto no líquido cefalorraquidiano e no sangue (GARCÍA *et al.*, 2003; MILLÁN *et al.*, 2010).

Além disso, o receptor GLUT 2, por onde a STZ parece atuar também no SNC, está localizado em áreas específicas do encéfalo, em particular no hipotálamo e tronco

cerebral, onde é encontrado em neurônios, astrócitos, *tanycytes* e células epiteliais que revestem os ventrículos cerebrais, o que explica as semelhanças nas alterações hipocâmpais (THORENS, 2011; LANFRAY *et al.*, 2013).

Os sesquiterpenos são compostos naturais com um teor de 15 carbonos na sua estrutura que são considerados importantes para a proteção de plantas e para humanos, apresentando muitas atividades biológicas, tais como propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitumorais e citotóxicas (CHADWICK *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2011).

O α -bisabolol é um álcool de sesquiterpeno, natural, monocíclico que possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-apoptótica (ROCHA *et al.*, 2011, BARRETO *et al.*, 2016). Recentemente foi demonstrada sua ação anti-amiloidogênica (SHANMUGANATHAN *et al.*, 2018), de inibição da colinesterase (SHANMUGANATHAN, 2015) e de neuroproteção contra déficit cognitivo (FERNANDES *et al.*, 2018).

Neste estudo, foi feita a dosagem da glicemia em todos os animais, sem restrição alimentar, antes dos procedimentos de indução e imediatamente antes da eutanásia dos animais, para confirmar se os animais não estavam diabéticos. Os resultados obtidos demonstraram que não houve nenhuma alteração nos níveis de glicose antes e após os procedimentos de indução, com o α -bisabolol e/ou STZ, nos grupos experimentais avaliados neste estudo. Também foi evidenciado que os níveis de glicemia dos animais estavam abaixo de 200 mg/dL, média de glicemia usada como base para classificar um animal diabético.

A não alteração nos níveis de glicose com as injeções de STZ corrobora com outros estudos como o de Pacheco e colaboradores (2018) e Bassani (2017), demonstrando não haver influência da STZ no nível basal da glicose sanguínea e, conseqüentemente, não induzindo a Diabetes Mellitus, mas no cérebro ela consegue alterar o metabolismo da glicose e gerar uma resistência insulínica (SALKOVIC-PETRISIC; HOYER, 2007). Este estado de resistência de insulina cerebral, induzido pela STZ central, vem sendo associado às mudanças morfológicas, moleculares e comportamentais que ocorrem na DAE (LESTER-COLL *et al.*, 2006).

A atividade locomotora avaliada pelo teste do campo aberto é medida através da determinação da distância percorrida, velocidade média, número de cruzamentos (*crossings*) e levantamentos (*rearings*) (BROADHURST (1957). O teste do campo aberto foi realizado no 12º dia após os procedimentos de indução de DAE. Os resultados obtidos 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; BIASIBETTI *et al.*, 2017), e demonstrando que não há déficit motor no modelo animal de DAE. O tratamento com o α -bisabolol também não alterou a atividade locomotora dos animais.

O teste do labirinto em Y é um teste utilizado na avaliação da memória de trabalho dos animais, onde é observando o número de alternações espontâneas corretas realizadas pelo animal (PLASCHKE; HOYER, 1993). A memória de trabalho corresponderia a uma determinada extensão da memória imediata e ocupa outras estruturas neurais, como o córtex pré-frontal (IZQUIERDO, 2011). Assim, é um espaço mental de trabalho que é necessário nas atividades cognitivas complexas, como o processo de leitura, por exemplo, porque ela conserva na consciência as sequências de palavras, que formam uma frase por tempo suficiente até que haja significação (BADDELEY; A. EYSENCK, 2011; IZQUIERDO, 2011). A memória de trabalho é dita como uma memória que trabalha com memórias, ela atua como um sistema de processamento que confronta as informações que estão chegando ao cérebro pelas vias sensoriais com as informações que já estão arquivadas nos sistemas cerebrais que compõem a memória de longa duração (ANDRADE; BUENO, 2004).

O teste do labirinto em Y foi realizado no 12º dia após os procedimentos de indução, onde se observou que os animais submetidos ao modelo de DAE apresentaram déficits na memória de trabalho. Estes resultados são consistentes com os achados de vários estudos anteriores em 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; GHASEMI-KASMAN *et al.*, 2018). Segundo alguns autores, essa diminuição da memória de trabalho pode ser explicada pelos efeitos do STZ nos receptores de insulina, reduzindo a glicose no cérebro e, conseqüentemente, resultando na diminuição de ATP e uma redução na produção de Acetil-CoA, resultando em déficits na memória (HOYER, 2004; SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2013).

O tratamento com o α -bisabolol na dose de 200 mg/kg aumentou de forma significativa as alternâncias espontâneas, demonstrando uma melhora na memória operacional de curta duração. Esse resultado se deve possivelmente a ação anti-colinesterásico do α -bisabolol, demonstrada nos estudos de Ionita e colaboradores (2018) e nos de Shanmuganathan e colaboradores (2015, 2018).

No estudo de Ionita e colaboradores (2018) foi demonstrado os efeitos benéficos anti-amnésicos, antioxidantes, anti-inflamatórios e potencial anti-colinesterásico do extrato hidroalcoólico de *Matricaria chamomilla*, uma das principais fontes de extração do α -bisabolol, na deficiência de memória induzida por escopolamina, onde também foi demonstrado uma melhora significativa na memória de trabalho, no labirinto em Y, nos animais tratados com esse extrato.

Cioanca e colaboradores (2013) demonstraram que o óleo essencial extraído da *Coriandrum sativum*, que tem como compostos principais os sesquiterpenos, popularmente conhecido como coentro, melhorou significativamente a memória de trabalho espacial no teste do labirinto em Y em animais em um modelo de DA induzido por $A\beta$ (1–42), devido a sua atividade anti-apoptótica e anti-oxidante.

O dano neuronal causado pela administração do STZ pode atingir diferentes regiões, como o septo, regiões do corpo caloso (KRASKA *et al.*, 2012), alterações ao nível do fórnice, córtex perirrinal, hipocampo anterior e estruturas periventriculares (SHOHAM *et al.*, 2003).

O córtex perirrinal é o local de entrada de muitas informações sensoriais como estímulos visuais, olfatórios e somatossensoriais envolvidos no reconhecimento de objetos e, envia impulsos nervosos para o hipocampo (ANTUNES; BIALA, 2012). Essa região está envolvida no reconhecimento de objetos após curtos períodos de intervalo (memória de curto prazo), enquanto o hipocampo é responsável pelo reconhecimento de objetos de longa duração. O hipocampo dorsal desempenha um papel importante especialmente quando informações espaciais ou de contexto são um fator relevante (ANTUNES; BIALA, 2012).

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). Esse é um teste robusto, muito utilizado para avaliar algumas regiões do cérebro como hipocampo, córtex perirrinal (WIN- SHWE; FUJIMAKI; 2011). 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 esta relacionada com o córtex perirrinal (WINTERS *et al.*, 2008).

Os animais que receberam as injeções de STZ apresentaram déficit na memória de reconhecimento, que foi avaliada 13 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). No cérebro, assim como na periferia, a insulina é considerada o regulador principal do metabolismo da glicose, atuando como um neurohormônio e neuromodulador e desempenha um papel importante no crescimento e sobrevivência neuronal (CORREIA *et al.*, 2011).

Tem sido sugerido também o papel na neurogênese para a formação de novos neurônios no hipocampo, tendo grande importância na aquisição e consolidação da memória de reconhecimento de objetos (JESSBERGER *et al.*, 2009; SUÁREZ-PEREIRA; CANALS; CARRIÓN, 2015). Alterações no processo de neurogênese em adultos foram evidenciadas em muitos estudos em tecidos *post-mortem* de pacientes acometidos pela DA e em vários modelos animais (BASSANI, 2017).

O tratamento com o α -bisabolol promoveu uma melhora no índice de reconhecimento de objeto em todas as doses, no entanto só houve melhora significativa com a dose de 100 mg/kg. Esse resultado se deve provavelmente a ação anti-oxidante do α -bisabolol evidenciada nos nossos resultados, na diminuição de peroxidação lipídica e diminuição do dano neuronal na bainha de mielina, avaliado por meio dos níveis de MDA, e possível ação anti-apoptótica do α -bisabolol demonstrada por Shanmuganathan e colaboradores (2018), resultando em uma melhora do aprendizado e memória, e redução no dano neuronal induzido pelo STZ.

A esQUIVA passiva é um dos testes mais utilizados para avaliar a memória e o aprendizado em animais (HUANG *et al.*, 2011). Esse modelo não depende apenas de estruturas cerebrais como o hipocampo, mas de outros como córtex entorrinal e amígdala (BLANK *et al.*, 2014), todos afetados pelo processo neurodegenerativo na doença de Alzheimer (SINGH *et al.*, 2014).

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. Esses resultados corroboram com outros estudos envolvendo o modelo de DAE, Kim e colaboradores (2016) demonstraram os efeitos neurotóxicos da STZ, como a redução na sinalização da insulina e o acúmulo de A β e proteína Tau no cérebro dos camundongos, resultando em déficits de memória. Estudos de Li e colaboradores (2017) demonstraram uma diminuição na memória tardia no modelo da esQUIVA passiva. Este déficit foi revertido pelo tratamento com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg

apenas na memória tardia (MT), provavelmente devido ao seu potencial anti-oxidante, demonstrado pelos nossos resultados e por estudos de Amoah e colaboradores (2015).

Os animais do grupo controle tratados com o α -bisabolol na dose de 200 mg/kg apresentaram déficits na retenção da MR e na MT, quando comparados aos animais do grupo controle, isso se deve provavelmente a toxicidade exercida pela alta concentração de α -bisabolol, no entanto, não foram achados dados na literatura que comprovassem esse efeito neurotóxico do α -bisabolol em altas concentrações.

Amoah e colaboradores (2015) demonstraram que animais submetidos ao modelo de DA induzida por peptídeo A β e tratados com sesquiterpenos lactonas, DS (13-hidroxi-8,9-dehidro-shizukanolide), PDA (Podoandin), e um álcool sesquiterpênico, ARD (aromadendrane-4 β ,10 α -diol), diminuíram significativamente o comprometimento da memória induzida pelo peptídeo A β 1-42 no teste de esQUIVA passiva e relacionou ao efeito anti-oxidante e anti-colinesterasico dessas substâncias. Outros estudos demonstraram o tratamento com óleo essencial extraído do *Borago officinalis*, em animais submetidos ao modelo de DA induzida por peptídeo A β , melhorou significativamente a memória aversiva no teste da esQUIVA passiva, devido a sua ação anti-oxidante (GHAHREMANITAMADON *et al.*, 2014).

Em 1984, Morris descreveu o teste do labirinto aquático, que é considerado um modelo robusto para avaliação de déficits na aprendizagem e na memória espacial, o qual vem sendo muito utilizado em vários modelos de estudos sobre a DAE experimental (KANG *et al.*, 2017; YING *et al.*, 2018). As referências externas a piscina, são fundamentais para formar uma percepção global de localização que depende, principalmente, do hipocampo (MORRIS, 1984). Lesões hipocampais produzem déficits na aquisição e retenção da memória espacial (RAMOS, 2013; BASSANI *et al.*, 2017). Nosso trabalho mostrou que os animais submetidos ao modelo de DAE apresentaram déficit na memória espacial através do teste do labirinto aquático, como foi observado em estudos de Kumar e Singh (2017).

Na avaliação do aprendizado espacial através do parâmetro tempo de latência para alcançar a plataforma, os animais que receberam as injeções de STZ demonstraram um maior tempo de latência quando comparados aos animais do grupo controle, corroborando com os resultados de Queiroz e colaboradores (2015) e com estudos de Ghasemi-Kasman e colaboradores (2018), que demonstraram um déficit na memória espacial. Estudos sobre os processos envolvidos na perda de memória neste modelo sugerem que ela é causada principalmente pela deficiência do metabolismo energético nos neurônios colinérgicos (LESTER-COLL *et al.*, 2006; TOTA *et al.*, 2011). Uma possível base biológica para justificar

este declínio na cognição seria que a deficiência do metabolismo energético e a menor disponibilidade de ATP no cérebro, gerada pelo STZ, é responsável pela menor produção tanto da Acetil-CoA quanto da colina-acetiltransferase (ChAT), responsáveis pela produção da acetilcolina, levando a um prejuízo dos mecanismos relevantes para a formação da memória devido a uma redução na transmissão sináptica (SZUTOWICZ *et al.*, 2013).

O tratamento com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg promoveu uma diminuição no tempo de latência nos animais que receberam STZ, demonstrando um efeito protetor contra os déficits na memória. Um estudo de nosso grupo também demonstrou os efeitos protetores do α -bisabolol na memória espacial no modelo de isquemia focal permanente, onde o tratamento com o α -bisabolol na dose e 200 mg/kg promoveu uma diminuição no tempo de latência para encontrar a plataforma no teste do labirinto aquático (FERNANDES, 2018). Esses resultados podem estar relacionados com o grande potencial anti-colinesterásico do α -bisabolol quando comparado ao medicamento padrão donepezil, já usado na clínica para o tratamento da DA, além de potencial de anti-agregação do α -bisabolol, os quais já foram demonstrados em estudos de cultura de células de Shanmuganathan e colaboradores (2015, 2018).

Esses resultados corroboram com estudos feitos com animais submetidos ao modelo de DA induzida por peptídeo A β (25–35) e tratados com o óleo essencial extraído do *Borago officinalis*, borragem, no qual os animais tratados apresentaram uma diminuição significativa no tempo de latência para encontrar a plataforma, devido a sua ação antioxidante (GHAHREMANITAMADON *et al.*, 2014).

Com relação ao tempo de permanência no quadrante, os animais que receberam STZ apresentaram uma diminuição no tempo de permanência no quadrante demonstrando uma diminuição da consolidação da memória espacial da localização da plataforma, corroborando com os achados de Sorial e colaboradores (2017). O α -bisabolol na dose de 100 mg/kg promoveu um aumento significativo no tempo de permanência no quadrante, demonstrando que os animais se lembravam do local da plataforma, confirmando haver uma melhora na memória espacial. Estudos feitos por Fernandes e colaboradores (2018) corroboram com nossos resultados, ao demonstrarem que o tratamento com o α -bisabolol nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg foi capaz de promover um aumento significativo no tempo de permanência no quadrante onde se encontrava a plataforma no teste do labirinto aquático, no modelo de isquemia cerebral focal permanente.

Esta proteção na memória espacial pelo α -bisabolol é consistente com os achados de Mao e colaboradores (2014), que demonstraram que a administração intraperitoneal de

huperzina A melhora os déficits na memória espacial avaliada no labirinto aquático em ratos diabéticos induzidos por STZ. A huperzina A, é um sesquiterpeno natural extraído da erva chinesa (*Huperzia Serrata*) inibidor reversível e seletivo da acetilcolinesterase (AChE) e tem sido utilizado, por várias décadas, para o tratamento clínico de demência, especialmente para DA na China, para o comprometimento neuronal induzido por diabetes, inflamação crônica e declínio cognitivo em indivíduos idosos (DAMAR *et al.*, 2016; YUE *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo tem sido associado ao início e progressão da DA (FISCHER; MAIER, 2015; KIM *et al.*, 2015), pois pode induzir dano lipídico na membrana, alterações nas enzimas críticas para a função neuronal e glial e dano estrutural ao DNA, levando a dano tecidual, disfunção de sinapse e morte celular (HUANG *et al.*, 2016).

O rompimento da sinalização da insulina, causado pelo envelhecimento ou alcançado através do STZ-icv, causa uma ampla gama de alterações neuronais incluindo metabolismo prejudicado, disfunção mitocondrial, diminuição da sinalização da insulina e aumento do estresse oxidativo, que estão associados a consequências indesejáveis para processos de aprendizagem e memória (HAAS, *et al.*, 2015).

Estudos tem demonstrado que a infusão de STZ causa comprometimento da memória em roedores através do aumento do estresse oxidativo, resultante de sua decomposição gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico, (KWON *et al.*, 1994) que leva à neuroinflamação crônica e dano neuronal, e que o estresse oxidativo e a apoptose podem desempenhar papéis importantes na neurodegeneração e prejuízos no metabolismo energético cerebral (NAZEM *et al.*, 2015; RAJASEKAR *et al.*, 2014).

O mau funcionamento dos 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 acetyl-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 acetyl-CoA, também no hipocampo, o que leva a uma interferência na transmissão colinérgica (ISHRAT *et al.*, 2006).

Uma tendência progressiva para o estresse oxidativo foi encontrada no córtex e região do hipocampo, com início em uma semana após a administração de icv-STZ em ratos (PATHAN *et al.*, 2006). Alterações significativas nos marcadores de dano oxidativo e diminuição do nível de ATP foram observadas no hipocampo e córtex cerebral, durante período de 2-3 semanas após a aplicação icv-STZ (ISHRAT, HODA, *et al.*, 2009). O aumento da geração de radicais livres e posterior estresse oxidativo são bem relatados quanto à geração

de prejuízos de aprendizado e memória, levando à disfunção cognitiva (ISHRAT, HODA, *et al.*, 2009). Além dos efeitos de estresse oxidativo, a administração de icv-STZ também tem sido associada com certas alterações morfológicas cerebrais, como extensa perda de células, neurodegeneração e astrogliose encontradas uma semana após o tratamento, independentemente da idade dos animais (SONKUSARE *et al.*, 2005).

Na avaliação da dosagem de nitrito/nitrato no hipocampo, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram um aumento significativo nas concentrações de nitrito. Estudos tem demonstrado haver um aumento do estresse oxidativo por meio das dosagens de nitrito, Superóxido Dismutase (SOD), TBARS, Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPx) no modelo de DAE por STZ (PACHECO *et al.*, 2018; KUMAR; SINGH, 2017). Os mecanismos subjacentes à neurotoxicidade mediada por A β ainda não estão claros, mas evidencia-se que o A β pode se acumular nas mitocôndrias, inibindo a cadeia transportadora de elétrons e levando a um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ao comprometimento do metabolismo energético mitocondrial (ALIKHANI *et al.*, 2011), além de danos à bainha de mielina, levando a uma disfunção cognitiva (SIMS-ROBINSON *et al.*, 2013).

A estrutura química da STZ sugere que este composto possa produzir radicais livres intracelulares, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (RAI *et al.*, 2014) que podem desencadear uma cascata de alterações bioquímicas e estruturais caracterizadas por diminuição do aporte de glicose ao neurônio, disfunção mitocondrial, diminuição de ATP, ativação de astrócitos e micróglia. Estes efeitos, em conjunto, podem levar a uma cascata de morte com formação de radicais livres, liberação de mediadores inflamatórios, hiperfosforilação da proteína Tau e agregados de peptídeo A β resultando em estresse oxidativo, neuroinflamação e morte celular (DESHMUKH *et al.*, 2009; MEHAN *et al.*, 2011).

Sabe-se que o α -bisabolol é um potente antioxidante como demonstrado por Rocha e colaboradores (2011) em modelo de edema de pata que avaliaram pela primeira vez sua atividade anti-nociceptiva e anti-inflamatória em roedores.

Em nosso estudo, o tratamento com o α -bisabolol não foi capaz de diminuir o aumento da concentração de nitrito em ambas as áreas cerebrais. Entretanto, estudos com óleo essencial obtido de folhas secas ou frescas de *Aloysia citrodora*, que possuem componentes terpênicos com altos teores de monoterpenos e sesquiterpenos, demonstrou atividades antioxidantes, sequestradoras de radicais e propriedades protetoras significativas contra a neurotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e beta-amiloide em culturas de

células CAD (*Cath-a-differentiated*), sendo consistentes com um perfil neuroprotetor (ABUHAMDAH *et al.*, 2015).

Um estudo feito com óleos essenciais de *H. gardnerianum* demonstrou que estes apresentam atividades antiacetilcolinesterásica, contribuindo para aumentar os níveis de acetilcolina nos neurônios colinérgicos, e antioxidante, o que os torna potencialmente úteis como adjuvantes no tratamento de doenças cognitivas, como a DA (ARRUDA *et al.*, 2012).

A estimativa do estresse oxidativo induzido por injeção icv-STZ comumente é medida em níveis de MDA, um produto da peroxidação lipídica utilizada como indicador de geração de radicais livres, e níveis de GSH (glutathiona), um antioxidante endógeno sequestrador de radicais livres e protetor contra estresse oxidativo e produção de substâncias com radical nitróxido livre (SHOHAM *et al.*, 2003). Sendo encontrados nos períodos de 1 e 8 semanas após uma única dose de 3mg/kg icv-STZ, sem envolvimento de óxido nítrico (SHOHAM *et al.*, 2003).

Na avaliação da dosagem de MDA no córtex pré-frontal e hipocampo, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram um aumento significativo nas concentrações de MDA no córtex pré-frontal, evidenciando um aumento da peroxidação lipídica e desestabilização da membrana plasmática, consequência da injúria neuronal causada pelo estresse oxidativo induzido pelo STZ e compostos resultantes da sua decomposição, gerando H_2O_2 e óxido nítrico, originando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (KWON *et al.*, 1994).

Como mencionado anteriormente, Pacheco e colaboradores (2018) demonstraram haver um aumento do estresse oxidativo pelas dosagens de TBARS, no modelo de DAE por STZ, outros estudos como o de Kumar (2017) também corroboraram com esses achados.

O tratamento com o α -bisabolol nas doses de 100 e 200 mg/kg foi capaz de diminuir o aumento da concentração de MDA apenas no córtex pré-frontal. Assim, o efeito antioxidante do α -bisabolol esteve envolvido no seu efeito neuroprotetor contra o dano oxidativo induzido pelo STZ, uma vez que o composto preveniu o tecido cerebral do aumento das EROs.

Estudos com outros sesquiterpenos tem demonstrado seus efeitos antioxidantes. Animais submetidos ao modelo de DA por peptídeo $A\beta$ e tratados com sesquiterpenos lactonas, DS (13-hidroxi-8,9-dehidro-shizukanolide), PDA (Podoandin), e um álcool sesquiterpênico, ARD (aromadendrane-4 β ,10 α -diol), apresentaram diminuição significativa nos níveis de TBARS e um aumento da atividade de GSH (AMOAH *et al.*, 2015).

Uma abordagem interessante como estratégia terapêutica nas doenças neurodegenerativas é a regeneração de axônios. O crescimento de neuritos e a diferenciação neuronal desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso. E podem correr em resposta à ação de proteínas sinápticas como, por exemplo, a sinaptofisina que promove aumento no número e densidade das sinapses neurológicas (CHEN *et al.*, 2009).

A sinaptofisina é uma proteína associadas à membrana pré-sináptica que pode ser encontrada em todas as terminações nervosas do sistema nervoso central e periférico, e atua regulando a fusão das vesículas sinápticas e a liberação de neurotransmissores, sendo um marcador importante da sinaptogênese (DAS *et al.*, 2004). A sinaptofisina I é conhecida por induzir o aumento do número e a densidade das sinapses neuronais, atuando no desenvolvimento neural, sendo, também, um indicador de plasticidade estrutural e de transmissão neuronal, com efeito positivo na função cognitiva (ZHANG *et al.*, 2014).

Estudos demonstram uma diminuição significativa na densidade sináptica nas áreas de associação neocorticais e do hipocampo na demência, áreas envolvidas na aprendizagem e na memória (STEPHEN; DOUGLAS, 2003).

A quantificação da sinaptofisina proporciona uma nova ferramenta para monitorar a densidade sináptica. Na avaliação da integridade da sinapse neuronal através da quantificação de sinaptofisina, constatou-se que os animais que receberam as injeções de STZ apresentaram diminuição significativa da expressão de sinaptofisina no hipocampo e no córtex pré-frontal. Evidências crescentes sugerem que a sinalização cerebral da insulina através dos receptores de insulina é importante para a plasticidade sináptica por modular a atividade de receptores excitatórios e inibitórios (i.e., receptores de glutamato e GABA). Adicionalmente, cascatas de transdução de sinal que são desencadeadas pela ativação de receptores de insulina levam à alterações na expressão de genes necessários para a consolidação da memória a longo prazo (CORREIA *et al.*, 2011).

Também tem sido evidenciado a neurotoxicidade exercida pelo acúmulo das formas oligoméricas fibrilares intracelulares do peptídeo A β , resultando na falha sináptica e dano neuronal em áreas corticais do cérebro essenciais para a memória e outros domínios cognitivos, que também podem contribuir para a neurodegeneração progressiva presente na DAE (VILLEMAGNE *et al.*, 2017). Estudos de RAVELLI e colaboradores (2016) também demonstraram uma diminuição dos níveis de sinapsina e sinaptofisina no hipocampo, proteínas de membrana de pré-sináptica no modelo de DAE.

O fator neurotóxico derivado do cérebro (BDNF) é também essencial para a potenciação de longo-prazo, contribuindo para a plasticidade sináptica, aprendizado e

memória (TAPIA-ARANCIBIA *et al.*, 2008) e juntamente com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), atua regulando a neurogênese no hipocampo. Em pacientes com a DA, a expressão de BDNF é bastante reduzida no hipocampo e algumas áreas corticais, como os córtices temporal e frontal (MURER; YAN; RAISMAN-VOZARI, 2001; TAPIA-ARANCIBIA *et al.*, 2008).

O tratamento com o α -bisabolol nas doses de 100 e 200 mg/kg inibiu significativamente a diminuição da sinaptofisina no hipocampo dos animais com DAE, demonstrando que o α -bisabolol é capaz de promover plasticidade sináptica.

Está bem documentado que a potenciação a longo prazo (LTP) e a plasticidade sináptica em neurónios são passos importantes para a aprendizagem e a memória. O rompimento dessas etapas leva a déficits cognitivos e a infusão de icv-STZ causa ruptura na plasticidade sináptica (XU *et al.*, 2014).

Estudos têm demonstrado o efeito sinaptogênico de outros sesquiterpenos, como o realizado com o beta-cariofileno, onde demonstraram que este foi capaz de aumentar significativamente a expressão da sinaptofisina e teve efeito positivo sobre o alongamento dos neuritos e na diferenciação celular, em um modelo celular de doenças neurodegenerativas em células PC12, sugerindo um possível efeito do beta-cariofileno na regeneração da rede de neuritos perdida no processo neurodegenerativo e efeito neuroprotetor devido a seu potencial antioxidante (FERREIRA, 2014).

Níveis diminuídos de sinaptofisina foram descritos no hipocampo de pacientes com DA (PERDAHL *et al.* 1984). A perda de sinapses descrita em pacientes com DA pode estar relacionada ao estado cognitivo encontrado nesses pacientes e pode representar uma razão estrutural para o declínio da função cognitiva (DEKOSKY; SCHEFF, 1990).

Uma das principais características histopatológicas da DA é a presença de placas amilóides extracelulares, compostas principalmente pelo peptídeo A β (WALSH *et al.*, 2002; CLEARY *et al.*, 2005). Além de vários fatores neurotóxicos, o peptídeo A β é mais potente que as neurotoxinas que causam a destruição da função das células neuronais, plasticidade sináptica e morte celular, o que sugere claramente que a inibição da oligomerização e a prevenção da morte celular induzida pelo A β podem levar a novas terapias e estratégias para o tratamento da DA (SHANMUGANATHAN *et al.*, 2018).

O peptídeo amiloide também induz a apoptose neuronal na DA, que é um tipo de morte celular programada controlada por um programa genético intrínseco específico, geralmente para controlar a população de células (LI *et al.* 2007; ZHI-KUN *et al.*, 2012).

Um estudo mostrou que as alterações patológicas no modelo de DAE por STZ, como redução da espessura cortical, afinamento do corpo caloso e formação de placas amiloides são dependentes do tempo decorrido desde a injeção da STZ, até 1 mês após a injeção sendo considerada uma resposta aguda, entre 1 e 3 meses uma fase compensatória e entre 6 e 9 meses uma fase descompensatória, com uma fase crônica de declínio progressivo (KNEZOVIC *et al.*, 2015).

Até o momento, os estudos utilizando o modelo de DAE por STZ só têm evidenciado a formação de placas A β com um mínimo de 3 meses após as injeções de STZ (SALKOVIC-PETRISIC *et al.*, 2006). Entretanto, estudos tem demonstrado haver um aumento significativo da expressão da proteína A β no hipocampo aos 14 dias após a administração de STZ e este efeito pareceu diminuir no dia 21 (RAVELLI *et al.*, 2016). Assim, tem sido sugerido que o acúmulo de placas A β no hipocampo, área que atua no processo de formação e consolidação de novas memórias, pode estar relacionado à redução do desempenho da memória ao longo do tempo, característicos da DAE (REITZ *et al.*, 2009).

Com base nesses estudos, realizamos a coloração com Tioflavina S para avaliação da formação de placas A β no córtex pré-frontal e hipocampo, nos animais submetidos ao modelo de DAE, entretanto não foi observada a formação de placas A β , provavelmente devido ao menor tempo de indução do modelo.

Um estudo recente demonstrou o efeito anti-amiloidogênico e anti-apoptótico do α -bisabolol contra a neurotoxicidade induzida por A β em cultura de células PC12, onde o tratamento com α -bisabolol (5 mg/ml) após 24 h de incubação com Ab25-35 reduziu a propensão de agregação de A β e essa inibição prosseguiu após 9 dias de incubação, que foi observado pela redução da intensidade de fluorescência da Tioflavina T (ThT) (SHANMUGANATHAN *et al.*, 2018). Cioanca e colaboradores (2013) demonstraram que o óleo essencial extraído da *Coriandrum sativum*, popularmente conhecido como coentro, diminuiu significativamente a formação de placas A β no hipocampo de animais em um modelo de DA induzido por A β (1–42), devido a sua atividade anti-apoptótica e anti-oxidante.

Estudos também tem demonstrado um potencial anti-colinesterasico e de anti-agregação do composto bioativo α -bisabolol presente na alga castanha *Padina gymnospora* (SHANMUGANATHAN, 2015). Sugerindo que o α -bisabolol pode ter efeito neuroprotetor por estas vias.

A AChE também está envolvida nas funções colinérgicas secundárias promovendo a deposição de A β na forma de placas ou ENF. Assim, sua inibição não só

desempenha um papel fundamental no aumento da neurotransmissão colinérgica no cérebro, mas também ajuda a reduzir a agregação de A β , fator chave na DA (REES *et al.*, 2003).

A coloração de cresil violeta tem sido amplamente utilizada como método histológico para identificar danos celulares no sistema nervoso e viabilidade celular (ALVAREZ-BUYLLA; LING; KIRN, 1990). A coloração de cresil-violeta é utilizada para evidenciar os corpúsculos de Nissl ou corpúsculos basófilos, constituídos por retículo endoplásmico rugoso responsável por síntese proteica, evidenciando a viabilidade celular, presentes no citoplasma de neurônios viáveis (SCORZA *et al.*, 2005). As células danificadas mostram varias características, incluindo um corpo celular encolhido com picnose (BARTUS *et al.*, 1995).

Na avaliação da integridade neuronal através da coloração com o cresil violeta, não foi evidenciada morte neuronal no córtex pré-frontal de animais submetidos às injeções de STZ, entretanto estudos de Biswas e colaboradores (2018) evidenciaram uma diminuição na viabilidade celular no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de DAE induzida por STZ, devido a significativa apoptose neuronal e fragmentação do DNA induzida pelo STZ.

O tratamento com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente o número de células viáveis no córtex pré-frontal quando comparado com o grupo STZ. Um estudo realizado pelo nosso grupo demonstrou o efeito citoprotetor do α -bisabolol na dose de 200 mg/kg, promovendo um aumento da viabilidade celular no córtex de camundongos submetidos ao modelo de isquemia focal permanente, devido a sua ação anti-inflamatória e antioxidante (FERNANDES *et al.*, 2018).

Na avaliação da integridade neuronal no hipocampo através da coloração com o cresil violeta, os animais submetidos às injeções de STZ apresentaram uma maior morte neuronal, diminuição das células viáveis, nas regiões do CA1 e CA3 do hipocampo. Estudos têm demonstrado haver uma diminuição significativa da viabilidade celular induzida pelo peptídeo A β -42 em modelo celular da DA (FERREIRA, 2014). Essa neurodegeneração está associada ao efeito tóxico direto de fragmentos A β sobre os neurônios, sendo o fragmento de peptídeo A β -42 o que está mais relacionado à formação de placas neuríticas (FAGARASAN; AISEN, 1996; ABDIPRANOTO *et al.*, 2008).

O tratamento com o α -bisabolol na dose de 100 mg/kg foi capaz de diminuir a morte neuronal, havendo um aumento significativo do número de células viáveis. Estes achados corroboram com um estudo feito com o beta-cariofileno, um sesquiterpeno que demonstrou que este foi capaz de diminuir significativamente a morte celular induzida pelo

peptídeo A β -42 em modelo celular da DA, devido ao seu efeito anti-apoptótico e anti-oxidante (FERREIRA, 2014).

O Fluoro-Jade C é um derivado aniônico de fluoresceína que é útil para a coloração histológica de neurônios em degeneração (SCHMUED; HOPKINS. 2005). No nosso trabalho, foi evidenciado um maior número de células positivas no córtex pré-frontal, na região CA3 do hipocampo e na região do Giro Denteado (GD) do hipocampo de animais submetidos às injeções de STZ, representando maior degeneração neuronal. Nossos resultados são corroborados por estudos de Biswas e colaboradores (2018), onde foi evidenciada uma degeneração neuronal significativa através da coloração com Fluoro Jade C no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos ao modelo de DAE induzida por STZ.

Nos animais controles, que receberam injeções de aCSF, o tratamento com o α -bisabolol na dose de 200 mg/kg promoveu um aumento significativo do número de células positivas nas regiões CA3 e GD do hipocampo, evidenciando um possível efeito neurotóxico do α -bisabolol em altas concentrações em um tratamento prolongado.

O tratamento com o α -bisabolol na dose de 50 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente o número de células positivas na região do CA3 nos animais com o modelo de DAE. E na dose de 200 mg/kg, o α -bisabolol foi capaz de diminuir significativamente o número de células positivas na região do CA3 e GD do hipocampo dos animais com DAE, demonstrando uma diminuição da degeneração neuronal. Corroborando com nossos resultados, Fernandes e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com o α -bisabolol na dose de 200 mg/kg foi capaz de prevenir a degeneração neuronal no córtex de camundongos submetidos ao modelo de isquemia focal permanente.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o α -bisabolol pode agir como neuroprotetor na DAE através da sua capacidade de proteção sináptica e por sua capacidade anti-oxidante, sendo este trabalho o primeiro a demonstrar a ação neuroprotetora do α -bisabolol em modelo de DAE induzido por STZ. Assim, o α -bisabolol é uma substância que pode ser testada em humanos, pois possui baixa toxicidade e é amplamente distribuída em vegetais, sendo uma molécula promissora para a pesquisa translacional na DA.

8 CONCLUSÃO

O α -bisabolol protegeu contra a neurotoxicidade induzida pelas injeções de STZ no modelo de DAE. Foi observado que o α -bisabolol diminuiu os déficits na memória de trabalho, na memória aversiva, na memória de reconhecimento e na memória espacial.

Esse efeito neuroprotetor se deve pelo aumento do número de células neuronais viáveis, diminuição da neurodegeneração e aumento da capacidade de proteção sináptica, evidenciada pelo aumento da expressão de sinaptofisina no hipocampo, e capacidade antioxidante demonstrada pela diminuição nas concentrações de MDA.

Assim, os resultados indicam que o tratamento com o α -bisabolol pode ser uma estratégia terapêutica adjuvante e promissora para o tratamento da DAE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDIPRANOTO, A.; WU, S.; STAYTE, S.; VISSSEL, B. The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. Apr; 7(2):187-210, 2008. PubMed PMID: 18537646. Epub 2008/06/10. eng.
- ABUHAMDAH, S.; ABUHAMDAH, R.; HOWES, M. J. R.; AL-OLIMAT, S.; ENNACEUR, A.; & CHAZOT, P. L. Pharmacological and neuroprotective profile of an essential oil derived from leaves of *Aloysia citrodora* Palau. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2015. <https://doi.org/10.1111/jphp.12424>
- AGRAWAL, R.; TYAGI, E.; SHUKLA, R.; NATH, C. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. **Eur. Neuropsychopharmacol.** 21, 261 e 273, 2011.
- ALIEV, G.; LI, Y.; PALACIOS, H. H.; OBRENOVICH, M. E. "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.; OBRENOVICH, M. E.; TABREZ, S.; JABIR, N. R.; REDDY, V. P.; LI, Y.; BURNSTOCK, G.; CACABELOS, R.; KAMAL, M. A. 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.
- ALIKHANI, N., GUO, L., YAN, S., DU, H., PINHO, C.M., CHEN, J.X., GLASER, E., YAN, S.S. Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid-beta degrading enzyme, PreP peptidosome, in Alzheimer's disease brain mitochondria. *J. Alzheimers Dis.* 27, 75-87, 2011.
- ALKON, D.L; EPSTEIN, H; KUZIRIAN, A; BENNETT, M.C; NELSON, T.J. Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning. *Proc Natl Acad Sci*, v.102, p.16432-16437, 2005
- ALLARD, S.; LEON, W. C.; PAKAVATHKUMAR, P.; BRUNO, M. A.; RIBEIRO-DA-SILVA, A.; CUELLO, A. C. "Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype." **J. Neurosci.** v. 32, p. 2002-2012, 2012.
- ALUISE, C. D.; SOWELL, R. A.; BUTTERFIELD, D. A. Peptides and proteins in plasma and cerebrospinal fluid as biomarkers for the prediction, diagnosis, and monitoring of therapeutic efficacy of Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta.**; 1782(10):549-58, oct, 2008.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement**, v. 6, n. 2, p. 158-94, Mar, 2010.
- AMOAH, S. K. S.; DALLA VECCHIA, M. T.; PEDRINI, B.; CARNHELUTTI, G. L.; GONÇALVES, A. E.; DOS SANTOS, D. A.; ... DE SOUZA, M. M. Inhibitory effect of sesquiterpene lactones and the sesquiterpene alcohol aromadendrane-4 β ,10 α -diol on memory impairment in a mouse model of Alzheimer. **European Journal of Pharmacology**, 769, 195-202, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.018>

ANAND, R.; GILL, K. D.; MAHDI, A. A. Therapeutics of alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, v. 76, p. 27–50, 2014.

ANDRADE, V. M.; SANTOS, F. H.; BUENO, O. F. A. Neuropsicologia hoje. São Paulo, SP: **Artes Médicas**, 2004.

ANSARI, M. A.; SCHEFF, S.W. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** v. 69, p. 155-67. 2010.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, v. 13, n. 2, p. 93– 110, 2012.

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.

ARENDRT, T. Synaptic degeneration in alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, v. 118, p. 167–179, 2009.

ARRUDA, M.; VIANA, H.; RAINHA, N.; NENG, N. R.; ROSA, J. S.; NOGUEIRA, J. M. F.; DO CARMO BARRETO, M. Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from *Hedychium gardnerianum sheppard ex ker-gawl*. **Molecules**, 17(3), 3082–3092, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules17033082>

ATTWELL, D.; IADECOLA, C. The neural basis of functional brain imaging signals. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 12, p. 621-5, Dec 2002.

BADDELEY; A. EYSENCK, M. A., M. Memória. Porto Alegre: **Artmed**, 2011.

BARANELLO, R. J.; BHARANI, K. L.; PADMARAJU, V.; CHOPRA, N.; LAHIRI, D. K.; GREIG, N. H.; *et al.* Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's Disease. **Curr Alzheimer Res**; 12:32-46, 2015.

BARRETO, R. S.; QUINTANS, J. S.; AMARANTE, R. K.; NASCIMENTO, T. S.; AMARANTE, R. S.; BARRETO, A. S.; ... QUINTANS-JUNIOR, L. J.. Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Lamiaceae) essential oil and (-)- α -bisabolol, its main compound, in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 191, 9–18, 2016.

BASSANI, T. B.; TURNES, J. M.; MOURA, E. L. R.; BONATO, J. M.; CÓPPOLA-SEGOVIA, V.; ZANATA, S. M., ... VITAL, M. A. B. F. 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(July), 41–54, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.014>

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.

BEACH, T. G.; MONSELL, S. E.; PHILLIPS, L. E.; KUKULL, W. Accuracy of the clinical diagnosis of Alzheimer disease at National Institute on Aging Alzheimer Disease Centers, 2005-2010. **J Neuropathol. Exp Neurol.**; 71(4):266-73, apr. 2012.

BEAR, M. F., CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neu-rociências: Desvendando o sistema nervoso (3. ed.). Porto Alegre, RS: Artmed, 2008.

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

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matchingto- sample learning task to study “recognition memory.” **Nat Protoc** 1:1306–1311, 2006.

BEZERRA, S. B.; LEAL, L. K.; NOGUEIRA, N. A.; CAMPOS, A. R. Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and KATP+ channels. **J. Med. Food** 12, 1403–1406, 2009.

BIASIBETTI, R.; ALMEIDA DOS SANTOS, J. P.; RODRIGUES, L.; WARTCHOW, K. M.; SUARDI, L. Z.; NARDIN, P, *et al.* Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. **Behav Brain Res** 316:205–14, 2017.

BIESSELS, G. J.; KAPPELLE, L. J. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology?. **Bioch Society Transactions**, 33(5), 1041-1044, 2005.

BISWAS, J.; GUPTA, S.; VERMA, D. K.; GUPTA, P.; SINGH, A.; TIWARI, S.;... SINGH, S. Involvement of glucose related energy crisis and endoplasmic reticulum stress: Insinuation of streptozotocin induced Alzheimer's like pathology. **Cellular Signalling**, 42(June 2017), 211–226, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.10.018>

BLANK, M., DORNELLES, A.S., WERENICZ, A., VELHO, L.A., PINTO, D.F., FEDI, A.C., SCHRODER, N., ROESLER, R.. Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. **Neurobiol. Learn. Mem.** 111, 1–8, 2014.

BLENNOW, K.; DE LEON, M. J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet** 368, 387-403, 2006.

BLESA, R. Noncognitive symptoms and long-term treatment expectations for Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 18 Suppl 1, p. S9-16, Apr-Jun, 2004. ISSN 0893-0341 (Print) 0893-0341.

BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic modelo of memory: long-term potentiation. **Nature**. v. 361, p. 31-39, 1993.

BLOKLAND, A.; JOLLES, J. Behavioral and biochemical effects of an ICV injection of streptozotocin in old Lewis rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 47:833–837, 1994.

BODENDORF, U.; DANNER, S.; FISCHER, F.; STEFANI, M.; STURCHLER- PIERRAT, C.; WIEDERHOLD, K.; STAUFENBIEL, M.; PAGANETTI, P. Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, n. 5, p. 799–806, 2002.

BOSCO, D.; FAVA, A.; PLASTINO, M.; MONTALCINI, T.; PUJIA, A. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. **J Cell Mol Med** 15: 1807–1821, 2011.

BREITNER, J. C. *et al.* Risk of dementia and AD with prior exposure to NSAIDs in an elderly community-based cohort. **Neurology**, v. 72, n. 22, p. 1899-905, Jun 2 2009. ISSN 0028-3878

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: I situational factors. **Brit. J. Psychol.**, v. 48, p. 1-12, 1957.

BURLÁ, C.; CAMARANO, A. A.; KANSO, S.; FERNANDES, D.; NUNES, R. Panorama prospectivo das demências no Brasil: um enfoque demográfico. **Cien Saude Colet**; v.18(10): p. 2949-2956, 2013.

BUTTERFIELD, D. A.; BADER LANGE, M. L.; R. Involvements of the lipidperoxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. **Biochim. Biophys. Acta** 1801, 924–929, 2010.

CALIGNON, A.; POLYDORO, M.; SUAREZ-CALVET, M.; WILLIAM, C.; ADAMOWICZ, D. H.; KOPEIKINA, K. J.; PITSTICK, R.; SAHARA, N.; ASHE, K. H.; CARLSON, G. A.; SPIRES-JONES, T. L. ; HYMAN, B. T . Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. **Neuron**, 73, pp. 685-697, 2012..

CEREJEIRA, J.; LAGARTO, L.; MUKAETOVA-LADINSKA, E. B. Behavioral and psychological symptoms of dementia. **Front Neurol**, v. 3, p. 73, 2012. ISSN 1664-2295.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WAGSTAFF, C., Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. **Int. J. Mol. Sci.** 14, 12780–12805. 2013.

CHAKRABARTI, S.; KHEMKA, V. K.; BANERJEE, A.; CHATTERJEE, G.; GANGULY, A.; BISWAS, A. Metabolic risk factors of sporadic Alzheimer's disease: implications in the pathology, pathogenesis and treatment. **Ageing Dis**; 6:282-299, 2015.

CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Oxidative stress in alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v. 13, p. 195-208, 2006.

CHEN, Q. F.; LIU, Z. P.; WANG, F.P. Natural sesquiterpenoids as cytotoxic antic-ancer agents. **Mini Rev. Med. Chem.** 11, 1153–1164., 2011.

CHEN, Y. *et al.* A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse). **Mol Neurobiol**, v. 47, n. 2, p. 711-25, Apr 2013. ISSN 0893-7648

CHEN, Z. A.; WANG, J. L.; LIU, R. T.; REN, J. P.; WEN, L. Q.; CHEN, X. J.; *et al.* Liquiritin potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells. **Cytotechnology**. Jul; 60(1-3):125-32, 2009. PubMed PMID: 19789989. Pubmed Central PMCID: 2780551. Epub 2009/10/01. eng.

CHERBUIN, N.; SACHDEV, P.; ANSTEY, K. J. Higher normal fasting plasma glucose is associated with hippocampal atrophy: the PATH study. **Neurology** 79:1019–1026, 2012.

CHIU, S. L.; CHEN, C. M.; CLINE, H. T. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function in vivo. **Neuron.**; 58(5):708–719, 2008.

CIOANCA, O.; HRITCU, L.; MIHASAN, M.; HANCIANU, M. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of inhaled coriander volatile oil in amyloid β (1-42) rat model of Alzheimer's disease. **Physiology and Behavior**, 120, 193–202, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.08.006>

CITRON, M. Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1055-7, Nov 2002. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256.

CLEARY, J. P.; WALSH, D.M.; HOFMEISTER, J.J.; SHANKAR, G.M.; KUSKOWSKI, M.A.; SELKOE, D.J.; ASHE, K.H. Natural oligomers of the amyloid-b protein specifically disrupt cognitive function, **Nat. Neurosci.** 8, 79 e 84, 2005.

CORREIA, S. C. *et al.* Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: Major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. **Brain Research**, v. 1441, p. 64–78, 2012.

CORREIA, S. C. *et al.* Insulin-resistant brain state: The culprit in sporadic Alzheimer's disease? **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 2, p. 264–273, 2011.

CORREIA, S.; SANTOS, R.; PERRY, G.; ZHU, X.; MOREIRA, P.; SMITH, M. Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic alzheimer's disease? *Ageing Research Reviews*, v. 10, n. 2, p. 264–273, 2011

CRAFT, S. Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. **Curr Alzheimer Res.**; 4(2):147–152, 2007.

CRANE, P. K.; WALKER, R.; HUBBARD, R. A.; LI, G.; NATHAN, D. M.; ZHENG, H.; HANEUSE, S.; CRAFT, S.; MONTINE, T. J.; KAHN, S. E.; MCCORMICK, W.; MCCURRY, S. M.; BOWEN, J. D.; LARSON, E. B. Glucose levels and risk of dementia. **N Engl J Med** 369:540–548, 2013.

CUIJPERS, P. Depressive disorders in caregivers of dementia patients: a systematic review. **Ageing Ment Health**; 9(4):325-330, 2005.

CUNNANE, S. *et al.* Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. **Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 3-20, Jan 2011. **Current aging science**, 4, pp. 118-127, 2011.

Da SILVA, A. P.; MARTINI, M. V.; DE OLIVEIRA, C. M.; CUNHA, S.; DE CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L.; DA SILVA, C. C. Antitumoractivityof (-)-alpha-bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor celllines. **Eur. J. Med. Chem.** 45, 2987–2993, 2010.

DAIBER, A.; DI LISA, F.; OELZE, M.; KRÖLLER-SCHÖN, S.; STEVEN, S.; SCHULZ, E.; MÜNZEL, T. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. **Br J Pharmacol**, 2015.

DAMAR, U.; GERSNER, R.; JOHNTONE, J.; SCHACTER, S.; ROTENBERG, A. 2Huperzine A as a neuroprotective and antiepileptic drug: A review of preclinical research. **Expert Rev Neurother**, 2016. [Epub ahead of print].

De CARVALHO, C.C.C.R.; Da FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.* 24, 134-142, 2006.

De FELICE, F. G. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. *J Clin Invest*, v. 123, n. 2, p. 531-9, Feb 2013.

De FELICE, F. G.; LOURENCO, M. V.; FERREIRA, S. T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? *Alzheimers Dement*, v. 10, n. 1 Suppl, p. S26-32, Feb 2014.

De La MONTE, S. M. Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep.* ;42(8):475-481, 2009.

De La MONTE, S. M. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer's disease: mini-review. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 24, n. 12, p. 1954-60, Dec 2014. ISSN 1873-7862. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25088942> >.

De LIRA, P. N.; ANDRADE, E. H.; SOUSA, P. J.; SILVA, N. N., *et al.* Essential oil composition of three *Peperomia* species from the Amazon, Brazil. *Nat Prod Commun* 4:427-430, 2009.

De NOBLE, V. J. *et al.* Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. *Pharmac. Biochem. Behav.*, v. 24: p. 1123-1128, 1986.

DEKOSKY, S. T.; SCHEFFS, W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457-464, 1990. doi:10.1002/ana.410270502

DESHMUKH, R. *et al.* Amelioration of intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive dysfunction and oxidative stress by vinpocetine -- a PDE1 inhibitor. *Eur J Pharmacol*, v. 620, n. 1-3, p. 49-56, Oct 12 2009. ISSN 0014-2999.

Di SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by beta- caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutation research*. Jun 17; 699(1-2):23-8, 2010. PubMed PMID: 20398787.

DRAPER, H. H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation, *Meth. Enzymol.* 186: 421-431, 1990.

DREVER, B.; RIEDEL, G.; PLATT, B. Hippocampal synaptic loss in early alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Behavioural Brain Research*, v. 221, n. 2, p. 505- 514, 2011

DUBEY, H.; GULATI, K.; & RAY, A. Amelioration by nitric oxide (NO) mimetics on neurobehavioral and biochemical changes in experimental model of Alzheimer's disease in rats. *NeuroToxicology*, 66, 58-65., 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.03.001>

DUBOIS, B.; FELDMAN, H. H.; JACOVA, C.; DEKOSKY, S. T.; BARBERGER-GATEAU, P.; CUMMINGS, J.; ... SCHELTENS, P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *The Lancet. Neurology*, 6(8), 734-46, 2007.

DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*, v.55, p.51-86, 2004.

DUDAI, Y.; MORRIS, R. Memorable trends. *Neuron*, v. 80, n. 3, p. 742–750, 2013.

DUELLI, R. et al. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci*, v. 12, n. 8, p. 737-43, Dec 1994. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7747600> >.

DUELLI, R.; KUSCHINSKY, W. Brain glucose transporters: relationship to local energy demand. *News Physiol Sci*, v. 16, p. 71-6, Apr 2001.

EILEEN DOLAN, M. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 26, n. 2-3, p. 105-118, Jul 07 1997.

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

ERICSSON, K. A.; KINTSCH, W. Long-term working memory. *Psychol. Rev.*, v. 102, n. 2, p. 211, 1995.

EYSENCK, M. K. M. Manual de Psicologia Cognitiva. 5ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2007.

FAGARASAN, M. O.; AISEN, P. S. IL-1 and anti-inflammatory drugs modulate A beta cytotoxicity in PC12 cells. *Brain research*. Jun 3; 723 (1-2):231-4, 1996. PubMed PMID: 8813406. Epub 1996/06/03. eng.

FERNANDES, M. Y. D.; SANTOS DO CARMO, M. R.; FONTELES, A. A.; DE SOUSA NEVES, J. C.; DA SILVA, A. T. A.; PEREIRA, J. F.; DE ANDRADE, G. M. (–)- α -Bisabolol prevents neuronal damage and memory deficits through reduction of proinflammatory markers induced by permanent focal cerebral ischemia in mice. *European Journal of Pharmacology*, 2018. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.09.036>

FERNANDES, M. Y. S. D. Efeito neuroprotetor do α -bisabolol em camundongos submetidos ao modelo de isquemia cerebral focal permanente. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, Fortaleza, 2015.

FERREIRA, D. A. S. Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas, 57, 2014.

FERRER, I. Altered mitochondria, energy metabolism, voltage-dependent anion channel, and lipid rafts converge to exhaust neurons in Alzheimer's disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 425–431, 2009.

FERRI, C. P.; JACOB, K. S. Dementia in low-income and middle-income countries: Different realities mandate tailored solutions. *PLoS medicine*, 14, 2017.

FINEFROCK, A. E.; BUSH, A. I.; DORCISWAMY, P. M. Current status of Metals as Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease. *J. AM. Geriatr. Soc.*, v. 51, p. 1143-1148, 2003.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev*; 610813, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/610813>.

FRANCO, R.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Successful therapies for alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Frontiers in Pharmacology*, v. 5, n. 146, 2013

FRIDMAN, C; GREGORIO, S. P.; DIAS NETO, E.; OJOPI, E. P. B. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Rev. psiquiatr. Clín.**, v.31, n.1, p. 19-25, 2004.

FROTA, N. A. F. *et al.*, Critérios para o Diagnóstico de Doença de Alzheimer. **Dementia e Neuropsychologia**, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2011.

GARCÍA, M.; MILLÁN, C.; BALMACEDA-AGUILERA, C.; CASTRO, T.; PASTOR, P.; MONTECINOS, H.; REINICKE, K.; ZÚÑIGA, F. *et al* Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. **J Neurochem** 86:709–724, 2003.

GARCIA, R. C. T. Efeitos neurodegenerativos da metilecgonidina e da cocaína em cultura celular primária de hipocampo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo: Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas), 2009.

GELLA, A. AND DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. **Cell Adh. Migr.**, v. 3, p. 88-93, 2009.

GEMELLI, T. E. A.; ANDRADE, R. B.; CASTRO, A. L.; GARCIA, L. P.; FUNCHAL, Cláudia. Estresse oxidativo como fator importante na fisiopatologia da Doença de Alzheimer. **Revista Uniara**, v.16, n.1, ju. 2013.

GENG, G.; LUO, H. M. The research progress of metals correlated to Alzheimer's disease. *Yao XueXueBao*, 2014.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nat. Chem. Biol.** 3, 408-414, 2007.

GHAHREMANITAMADON, F.; SHAHIDI, S.; ZARGOOSHNIYA, S.; NIKKHAH, A.; RANJBAR, A.; ASL, S. S. Protective Effects of *Borago officinalis* Extract on Amyloid - Peptide (25 – 35) -Induced Memory Impairment in Male Rats : A Behavioral Study, 2014. <https://doi.org/2014/798535>

GHASEMI-KASMAN, M., SHOJAEI, A., GOL, M., MOGHADAMNIA, A. A., BAHARVAND, H., & JAVAN, M. miR-302/367-induced neurons reduce behavioral impairment in an experimental model of Alzheimer's disease. **Molecular and Cellular Neuroscience**, 86 (June 2017), 50–57, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.11.012>

GIBBONS, G. S.; BANKS, R. A.; KIM, B.; CHANGOLKAR, L.; RIDDLE, D. M.; LEIGHT, S. N.; IRWIN, D. J.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M. Y. Detection of Alzheimer Disease (AD)-Specific Tau Pathology in AD and NonAD Tauopathies by Immunohistochemistry With Novel Conformation-Selective Tau Antibodies. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, 77, pp. 216-228, 2018.

GILBERT, B. J. The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Clin Pathol** 66:362–366, 2013.

GOATE, A. Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, v. 9, n. 3, p. 341–347, 2006.

GOLD, P.E.; McGAUGH, J. L. A single-trace, two-processes view of memory storage processes. In: DEUTSCH, D.; DEUTSCH, J.A. (eds). *Short-term memory*. Academic Press, New York, p.355-378, 1975.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L, WISHNOK J. S, TANNENBAUM S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal.Biochem.* 126: 131-138, 1982.

GRIEB, P. Intracerebroventricular streptozotocin injections as a model of Alzheimer's disease: in search of a relevant mechanism. *Mol. Neurobiol.* 53, 1741–1752, 2016.

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

GUTIERREZ, B. A. O., SILVA, H. S. DA, GUIMARÃES, C., & CAMPINO, A. C. Impacto econômico da doença de Alzheimer no Brasil: é possível melhorar a assistência e reduzir custos? *Ciência & Saúde Coletiva*, 19(11), 4479–4486, 2014.<https://doi.org/10.1590/1413-812320141911.03562013>

HAAS, C. B.; KALININE, E.; ZIMMER, E. R.; HANSEL, G.; BROCHIER, A.W.; OSES, J. P.; PORTELA, L.V.; MULLER, A. P. Brain insulin administration triggers distinct cognitive and neurotrophic responses in young and aged rats, *Mol. Neurobiol.* 26, 2015.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. *Journal of Comparative Psychology*, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.*, v. 32, p. 125- 30, 2011.

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.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant.Physiology*, v. 141, p. 312-322, 2006b.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Measurement of reactive species. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radic. Biol. Med.* 4 ed. Oxford University Press, Oxford, p. 268-340, 2007.

HELMES, E.; OSTBYE, T. Beyond memory impairment: cognitive changes in Alzheimer's disease. *Arch Clin Neuropsychol*, v. 17, n. 2, p. 179-93, Feb 2002. ISSN 0887-6177 (Print) 0887-6177.

HOWES, M. J.; HOUGHTON, P. J. Ethno-botanical treatment strategies against Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*; 1: 67–85, 2012.

- HOYER, S.; LANNERT, H. Long-term abnormalities in brain glucose/ energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein. **J Neural Transm Suppl.** 72:195–202, 2007.
- HUANG, J. J.; LIU, X.; WANG, X. Q.; YANG, L. H.; QI, D. S.; YAO, R. Q. Effects of quercetin on the learning and memory ability of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi** 14:454-457, 2012.
- HUANG, W. J.; ZHANG, X.; CHEN, W. W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (review). **Biomed Rep;** 4(5):519–22, 2016.
- HUANG, y.; MUCKE, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, v. 148, n. 6, p. 1204–1222, 2015.
- IONITA, R.; POSTU, P. A.; MIHASAN, M.; GORGAN, D. L.; HANCIANU, M.; CIOANCA, O.; HRITCU, L. Ameliorative effects of Matricaria chamomilla L. hydroalcoholic extract on scopolamine-induced memory impairment in rats: A behavioral and molecular study. *Phytomedicine*, 47(November 2017), 113–120, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.049>
- IQBAL, K.; LIU, F.; GONG, C. X. **Tau and neurodegenerative disease: the story so far.** *Nature reviews Neurology*, 12, pp. 15-27, 2016.
- ISHRAT, T. et al. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 9, p. 636-47, ISSN 0924- 977x, Sep 2009.
- ISHRAT, T. *et al.* Coenzyme Q10 modulates cognitive imparment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. **Behav. Brain. Res.**, v. 171, p. 9-16, 2006.
- IZQUIERDO, I. *Memória* (2. ed.). Porto Alegre, RS: **Artmed**, 2011.
- IZQUIERDO, I.; McGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav. Pharmacol.**, v. 11, p. 517-534, 2000.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997. ISSN 1074-7427. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398590> >
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. GABA A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 260-265, 1991.
- JESSBERGER, S. *et al.* Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. **Learning & Memory**, v. 16, n. 2, p. 147–154, 2009.
- JOHN, G. R.; LEE, S. C.; BROSNAN, C. F. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. **Neuroscientist**, v. 9, n. 1, p. 10-22, Feb 2003.

KANG, S.; KIM, C. H.; JUNG, H.; KIM, E.; SONG, H. T.; & LEE, J. E. Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signalling. **Neuropharmacology**, *113*, 467–479, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.029>

KAR, S.; SLOWIKOWSKI, S. P.; WESTAWAY, D.; MOUNT, H. T. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. **J Psychiatry Neurosci** *29*, 427-41, 2004.

KEMPERMANN, G.; GAST, D.; GAGE, F. H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. **Ann. Neurol.** *52*, 135 e 143, 2002.

KESMATI, M.; BARFINEJAD, N.; MOGHADAM, H. F. Effect of *Matricaria recutita* on acute pain in the presence and absence of sex hormones, **Journal of Research in Medical Sciences** *12*, 190–197, 2007.

KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A.; KENAWY, S.A.; SEIF-EL-NASR, M.; MAHRAN, L. G.; KAFABI, Y. A.; OKPANYI, S.N. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. **Arzneimittelforschung**, v. 51, p. 545–553, 2001.

KIM, D.-Y., JUNG, S.-Y., KIM, K., & KIM, C.-J. Treadmill exercise ameliorates Alzheimer disease-associated memory loss through the Wnt signaling pathway in the streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, *12*(4), 276–283, 2016. <https://doi.org/10.12965/jer.1632678.339>

KIM, G. H.; KIM J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Exp Neurobiol**; *24*(4):325–40, 2015.

KIM, S.; JUNG, E.; KIM, J. H.; PARK, Y. H.; LEE, J.; & PARK, D. Inhibitory effects of (-)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, *49*, 2580– 2585, 2011.

KIM, T. S.; PAE, C. U.; YOON, S. J.; JANG, W. Y.; LEE, N. J.; KIM, J. J.; LEE, S. J.; LEE, C.; PAIK, I. H.; LEE, C. U. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. **Int. J. Geriatr. Psychiatry** *21*, 344–348, 2006.

KLUNK, W.; ENGLER, H.; NORDBERG, A.; WANG, Y.; BLOMQUIST, G.; HOLT, D.; BERGSTROM, M.; SAVITCHEVA, I.; HUANG, G.; ESTRADA, S.; AUSEN, B.; DEBNATH, M.; BARLETTA, J.; PRICE, J.; SANDELL, J.; LOPRESTI, B.; WALL, A.; KOIVISTO, P.; ANTONI, G.; MATHIS, C.; LANGSTROM, B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B **Annals of Neurology**, *55* (3), 306-319, 2004. DOI: [10.1002/ana.20009](https://doi.org/10.1002/ana.20009)

KNEZOVIC, A.; OSMANOVIC-BARILAR, J.; CURLIN, M.; HOF, P. R.; SIMIC, G.; RIEDERER, P, *et al.* Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. **J Neural Transm**; *122*(4):577–92, 2015.

KRASKA, A.; SANTIN, M. D.; DORIEUX, O.; JOSEPH-MATHURIN, N.; BOURRIN, E.; PETIT, F, et al. In vivo cross-sectional characterization of cerebral alterations induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin. *PLoS One*; 7(9):e46196, 2012.

KUMAR, A., & SINGH, N. Inhibitor of Phosphodiesterase-4 improves memory deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neuropathological alterations in mouse models of dementia of Alzheimer's Type. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 88, 698–707, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.059>

KUMAR, R.; JAGGI, A. S.; SINGH, N. Effects of erythropoietin on memory deficits and brain oxidative stress in the mouse models of dementia. **Korean J Physiol Pharmacol** 14:345–352, 2010.

KUSHNAREVA, Y, NEWMAYER, D.D. Bioenergetics and cell death. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 1201 p. 50-7. 2010.

KWON, N. S. *et al.* Nitric oxide generation from streptozotocin. **FASEB journal**, v. 8, n. 8, p. 529–533, 1994.

LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience and biobehavioral reviews** 26:91–104, 2002.

LAMMICH, S. et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 7, p. 3922-7, Mar 30 1999.

LANFRAY, D.; ARTHAUD, S.; OUELLET, J.; COMPÈRE, V.; DO REGO, J. L.; LEPRINCE, J.; LEFRANC, B.; CASTEL, H. *et al.* Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. **Diabetes** 62:801–810, 2013.

LANGA, K. M.; LARSON, E. B.; CRIMMINS, E. M.; FAUL, J. D.; LEVINE, D. A.; KABETO, M. U.; & WEIR, D. R. A comparison of the prevalence of dementia in the United States in 2000 and 2012. **JAMA Internal Medicine**, v. 177, n.(1), p. 51–58, 2017. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.680>.

LANGLET, F.; MULLIER, A.; BOURET, S. G.; PREVOT, V.; DEHOUCQ, B. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. **J Comp Neurol** 521: 3389–3405, 2013.

LANNERT, H.; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behav Neurosci**, v. 112, n. 5, p. 1199-208, Oct 1998. ISSN 0735-7044. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829797> >

LEITE, G. D. E. O.; LEITE, L. H.; SAMPAIO, R. D. E.; ARARUNA, M. K.; DE MENEZES, I. R.; DA COSTA, J.G.; CAMPOS, A. R. (-)-Alpha-Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. **Fitoterapia** 82, 208–211, 2011.

LEITE, G. O.; FERNANDES, C. N.; DE MENEZES, I. R.; DA COSTA, J. G.; & CAMPOS, A. R. Attenuation of visceral nociception by a-bisabolol in mice: Investigation of mechanisms. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, 2, 18, 2012.

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

LENT, R. Cem bilhões de neurônios?: Conceitos fundamentais de neurociência (2. ed.). São Paulo, SP: **Atheneu**, 2010.

LESTER-COLL, N.; RIVERA, E.; SOSCIA, S.; DOIRON, K.; WANDS, J.; DE LA MONTE, S. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, v. 9, n. 1, p. 13–33, 2006.

LI, L., QIN, L., LU, H. LONG, LI, P. J., SONG, Y. J., & YANG, R. L. Methylene blue improves streptozotocin-induced memory deficit by restoring mitochondrial function in rats. **Brain Research**, 1657, 208–214, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.12.024>

LI, M.; CHEN, L.; LEE, D. H.; YU, L. C.; ZHANG, Y. The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. In: *Prog Neurobiol*, vol 83. vol 3. **England**, pp 131–139, 2007. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.08.002

LIU *et al.*,. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol*, v. 225, n. 1, p. 54-62, Sep 2011.

LIVINGSTON, G.; SOMMERLAD, A.; ORGETA, V.; COSTAFREDA, S. G.; HUNTLEY, J.; AMES, D.; BALLARD, C.; BANERJEE, S.; BURNS, A.; COHEN-MANSFIELD, J.; COOPER, C.; FOX, N.; GITLIN, L. N.; HOWARD, R.; KALES, H. C.; LARSON, E. B.; RITCHIE, K.; ROCKWOOD, K.; SAMPSON, E. L.; SAMUS, Q.; SCHNEIDER, L. S.; SELBAEK, G.; TERI, L.; MUKADAM, N. Dementia prevention, intervention, and care. **The Lancet (London, England)**, 390, pp. 2673-2734, 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31363-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31363-6)

LOIZZO, M. R. *et al.* Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and anticholinesterase activities of Origanum ehrenbergii Boiss and Origanum syriacum L. essential oils. **Food Chem**; 117: 174–180, 2009.

LY, P. T. T.; CAI, F.; & SONG, W. Detection of Neuritic Plaques in Alzheimer's Disease Mouse Model Video Link. **J. Vis. Exp**, 53(10), 2011. <https://doi.org/10.3791/2831>

MAO, X.-Y.; CAO, D.-F.; LI, X.; YIN, J.-Y.; WANG, Z.-B.; ZHANG, Y.; ... LIU, Z.-Q. Huperzine A Ameliorates Cognitive Deficits in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, 15(5), 7667–7683, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms15057667>

MARTHA, L.; DAVIGLUS M. L.; PLASSMAN B.L.; PIRZADAA A.; BELL, C.C.; BOWEN P.E; BURKE, J.R.; CONNOLLY JR. E.S.; DUNBAR- JACOB J. M.; GRANIERI, E.C.; MCGARRY, K.; PATEL D.; TREVISAN M.; WILLIAMS JR, J.W. Risk Factors and Preventive Interventions for Alzheimer Disease: **State of the Science**. *Arch. Neurol.*, v. 68, p. 1185-1190, 2011.

MARUMOTO, S.; OKUNO, Y.; MIYAZAWA, M. Inhibition of β -Secretase Activity by Monoterpenes, Sesquiterpenes, and C₁₃ Norisoprenoids. **Journal of Oleo Science**, 855(8), 851–855, 2017. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16188>.

MAZZATORTA, P.; SMIESKO, M.; PIPARO, E.L.; BENFENATI, E. QSAR model for predicting pesticide aquatic toxicity. *J. Chem. Inform. Model.*, v. 45, p. 1767–1774, 2005.

MCKAY, D. L., & Blumberg, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytotherapy Research**, 20, 519–530, 2006.

MCKHANN, G.M.; KNOPMAN, D.S.; CHERTKOW, H.; HYMAN, B.T.; JACK, C.R.; KAWAS, C.H.; KLUNK, W.E.; KOROSHETZ, W.J.; MANLY, J.J.; MAYEUX, R.; MOHS, R.C.; MORRIS, J.C.; ROSSOR, M.N.; SCHELTENS, P.; CARRILLO, M.C.; THIES, B.; WEINTRAUB, S.; MEGA, M. S. Differential diagnosis of dementia: clinical examination and laboratory assessment. **Clin. Cornerstone**, v. 4, p. 53-65, 2002.

MEGA, M. S. Differential diagnosis of dementia: clinical examination and laboratory assessment. **Clin. Cornerstone**, v. 4, p. 53-65, 2002.

MEHAN, S. *et al.* JNK: a stress-activated protein kinase therapeutic strategies and involvement in Alzheimer's and various neurodegenerative abnormalities. **J Mol Neurosci**, v. 43, n. 3, p. 376-90, Mar 2011. ISSN 0895-8696..

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

MICHAEL, T.; LIN, M.; FLINT, BEAL. 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.

MILLÁN, C.; MARTÍNEZ, F.; CORTÉS-CAMPOS, C.; LIZAMA, I.; YAÑEZ, M. J.; LLANOS, P.; REINICKE, K.; RODRÍGUEZ, F. *et al.* Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. **ASN Neuro** 2:e00035, 2010.

MISHRA, S. K.; SINGH, S.; SHUKLA, S.; SHUKLA, R. Intracerebroventricular streptozotocin impairs adult neurogenesis and cognitive functions via regulating neuroinflammation and insulin signaling in adult rats. **Neurochemistry International**, 113, 56–68, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.11.012>

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

MOSCONI, L.; SORBI, S.; DE LEON, M. J.; LI, Y.; NACMIAS, B.; MYOUNG, P. S.; TSUI, W.; GINESTRONI, A. *et al.* Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. **J Nucl Med** 47:1778–1786, 2006.

MOSCOVITCH, M. Memory and working-with-memory: A component process model based on modules and central systems. *J. Cognit. Neurosci.*, v. 4, n.3, p. 257-267, 1992.

MUCKE, L.; MASLIAH, E.; YU, G.; MALLORY, M.; ROCKENSTEIN, E.; TATSUNO, G.; HU, K.; KHOLODENKO, D.; JOHNSON-WOOD, K.; MCCONLOGUE, L. High- level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic

mice: synaptotoxicity without plaque formation. *Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 11, p. 4050–4058, 2000.

MURAKAMI, A.; TANAKA, T.; LEE, J.-Y.; SURH, Y.-J.; KIM, H.W.; KAWABATA, K.; NAKAMURA, Y.; JIWAJINDA, S.; OHIGASHI, H. Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *Int. J. Cancer*, v. 110, p. 481–490, 2004.

MURER, M. G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 63, n. 1, p. 71–124, 2001.

NAZEM, A.; SANKOWSKI, R.; BACHER, M.; AL-ABED, Y. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. **J. Neuroinflammation**, 12, 74, 2015.

ODDO, S.; CACCAMO, A.; SHEPHERD, J.; MURPHY, M.; GOLDE, T.; KAYED, R.; METHERATE, R.; MATTSON, M.; AKBARI, Y.; LAFERLA, F. Triple-transgenic model of alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, v. 39, n. 3, p. 409–421, 2003.

OHARA, T.; DOI, Y.; NINOMIYA, T.; HIRAKAWA, Y.; HATA, J.; IWAKI, T.; KANBA, S.; KIYOHARA, Y. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. **Neurology**, v. 77 pp. 1126-1134, 2011.

ORTIZ, M. I.; CARIÑO-CORTÉS, R.; PONCE-MONTER, H. A.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; & CHÁVEZ-PIÑA, A. E. Pharmacological interaction of α -bisabolol and diclofenac on nociception, inflammation, and gastric integrity in rats. **Drug Dev. Res.** 2018; 79:29–37, 2018. <https://doi.org/10.1002/ddr.21418>

PACHECO, S. M.; SOARES, M. S. P.; GUTIERRES, J. M.; GERZSON, M. F. B.; CARVALHO, F. B.; AZAMBUJA, J. H.; ... SPANEVELLO, R. M. 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. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 56, 193–204, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.014>

PAL, S.; TYLER, J. K. Epigenetics and aging. **Sci Adv**, v. 2, n. 7, p. e1600584, Jul 2016.

PALOP, J.; MUCKE, L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature Neuroscience*, v. 13, n. 10, p. 812–818, 2010.

PARK, K. M.; BOWERS, W. J. Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. **Cell Signal**; 22:977–83, 2010.

PARK, S. J.; KIM, Y. H.; NAM, G. H.; CHOE, S. H.; LEE, S. R.; KIM, S. U, *et al.* Quantitative expression analysis of APP pathway and tau phosphorylation-related genes in the ICV STZ-induced non-human primate model of sporadic Alzheimer's disease. **Int J Mol Sci**; 16:2386-2402, 2015.

PATHAN, A. R. *et al.* Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. **Life Sci**, v. 79, n. 23, p. 2209-16, Nov 2 2006. ISSN 0024-3205 (Print) 0024- 3205.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **Gulf Professional Publishing**, 2004.

PERDAHL, E.; ADOLFSSON, R.; ALAFUZOFFI.; ALBERT, K. A.; NESTLER, E. J.; GREENGARD, P.; WINBLAD, B. Synapsin I (protein I) in different brain regions in senile dementia of Alzheimer type and in multi-infarct. Dementia. **J Neural Transm** 60:133–141, 1984.

PÉREZ, M. A.; ARANCIBIA, S.R. Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? **Arch. Neurocién.**, v. 12, p. 45-54, 2007.

PERL, D. P. Neuropathology of Alzheimer's disease and related disorders. **Neurol. Clin.**, v. 18, p. 847, 2000.

PHIEL, C.; WILSON, C.; LEE, V.; KLEIN, P. Gsk-3alpha regulates production of alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*, v. 423, n. 6938, p. 435–439, 2003.

PHILIPSON, O.; LORD, A.; GUMUCIO, A.; O'CALLAGHAN, P.; LANNFELT, L.; NILSSON, L.N. Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. **FEBS J.**, v.277, p.1389-409, 2010.

PIOCHON, M.; LEGAULT, J.; GAUTHIER, C.; PICHETTE, A. Synthesis and cytotoxicity evaluation of natural alpha-bisabolol beta-D-fucopyranoside and analogues. **Phytochemistry** 70, 228–236, 2009. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2008.11.013>

POOLER, A.; NOBLE, W.; HANGER, D. P. A role for tau at the synapse in alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology*, v. 76, p. 1–8, 2014.

POPOVIĆ, V.; PETROVIĆ, S.; PAVLOVIĆ, M.; MILENKOVIĆ, M.; COULADIS, M.; TZA-KOU, O.; NIKETIĆ, M. Essential oil from the underground parts of *Laserpitium zernyi*: Potential source of alpha-bisabolol and its antimicrobial activity. **Natural Product Communication**, 5, 307–310, 2010.

PREDIGER, R. D. S. Prejuízos olfativos e cognitivos em modelos da doença de Parkinson em ratos. Participação de mecanismos adenosinérgico e dopaminérgico. 2005. 141f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PRINCE, M. J. *et al.*, World Alzheimer Report 2016 - Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, quality and costs now and in the future. **Alzheimer's Disease International. London**, p.131, 2016.

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

QUEIROZ, J. S. B. Modelo de Demência de Alzheimer Esporádica induzida por injeção intracerebroventricular de estreptozotocina: avaliação da memória em camundongos, 48 p, 2015. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 362, n. 4, p. 329-44, Jan 28 2010.

- RAJASEKAR, N.; DWIVEDI, S.; NATH, C.; HANIF, K.; SHUKLA, R. Protection of streptozotocin induced insulin receptor dysfunction, neuroinflammation and amyloidogenesis in astrocytes by insulin. **Neuropharmacology**, 86, 337–352, 2014.
- RAMOS, J. M. J. Differential contribution of hippocampus, perirhinal cortex and postrhinal cortex to allocentric spatial memory in the radial maze. **Behavioural Brain Research**, v. 247, p. 59–64, 2013.
- RANI, V.; DESHMUKH, R.; JASWAL, P.; KUMAR, P.; BARIWAL, J. Alzheimer's disease: Is this a brain specific diabetic condition? **Physiology & Behavior**, 164; 259–267, 2016.
- RAVELLI, K. G.; ROSÁRIO, B. DOS A.; CAMARINI, R.; HERNANDES, M. S.; & BRITTO, L. R. Intracerebroventricular Streptozotocin as a Model of Alzheimer's Disease: Neurochemical and Behavioral Characterization in Mice. **Neurotoxicity Research**, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9684-7>
- REES, T.; HAMMOND, P. I.; SOREQ, H.; YOUNKIN, S.; BRIMIJOIN, S. Acetylcholinesterase promotes beta- amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiology of Aging* 24:777–787, 2003. PMID: 12927760
- REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 3, p. 137-52, Mar 2011. ISSN 1759-4758.
- REITZ, C.; HONIG, L.; VONSATTEL, J. P.; TANG, M. X.; MAYEUX, R. Memory performance is related to amyloid and tau pathology in the hippocampus. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 80:715–721, 2009. doi:10.1136 /jnnp.2008.154146
- REYNOLDS, J. E. F. Martindale, the extra pharmacopoeia. **The Pharmaceutical**, London, 1996.
- ROBERT, R. et al. Engineered antibody intervention strategies for Alzheimer's disease and related dementias by targeting amyloid and toxic oligomers. **Protein Eng Des Sel**, v. 22, n. 3, p. 199-208, Mar 2009. ISSN 1741-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927231> >
- ROBLES, M.; AREGULLIN, M.; WEST, J.; RODRIGUEZ, E. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta medica*. Jun;61(3):199-203, 1995. PubMed PMID: 7617758.
- ROCHA, N. F.; RIOS, E. R.; CARVALHO, A. M.; CERQUEIRA, G. S.; LOPES ADE, A.; LEAL, L. K.; ... DE SOUSA, F. C. Anti-nociceptive and anti- inflammatory activities of (-)-a-bisabolol in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 384, 525–533, 2011a.
- RODRIGUEZ, G. et al. Psychological and social aspects in management of Alzheimer's patients: an inquiry among caregivers. **Neurol Sci**, v. 24, n. 5, p. 329-35, Dec 2003. ISSN 1590-1874 (Print) 1590-1874.
- SALKOVIC-PETRISIC, M.; HOYER, S. Central insulin resistance as a trigger for sporadic Alzheimer-like pathology: an experimental approach. **J Neural Transm Suppl** 72, 217– 233, 2007.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; KNEZOVIC, A.; HOYER, S.; RIEDERER, P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. **J. Neural Transm.** (Vienna) 120, 233e252, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0877-9>

SALKOVIC-PETRISIC, M.; TRIBL, F.; SCHMIDT, M.; HOYER, S.; RIEDERER, P. Alzheimer- like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **J Neurochem** 96, 1005-15, 2006.

SARACENO, C.; MUSARDO, S.; MARCELLO, E.; PELUCCHI, S.; & DI LUCA, M. Modeling Alzheimer's disease: From past to future. **Frontiers in Pharmacology**, 4 JUN(June), 1–22, 2013. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00077>

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology** 94: 491-495, 1988.

SARTORIUS, T.; PETER, A.; HENI, M.; MAETZLER, W.; FRITSCHKE, A.; HEARING, H.-U.; HENNIGE, A. M. The brain response to peripheral insulin declines with age: a contribution of the blood-brain barrier? **PLoS One** 10, e 0126804, 2015.

SATO, N.; TAKEDA, S.; UCHIO-YAMADA, K.; UEDA, H.; FUJISAWA, T.; RAKUGI, H.; MORISHITA, R. Role of insulin signaling in the interaction between Alzheimer disease and diabetes mellitus: a missing link to therapeutic potential

SAXENA, G.; PATRO, I, K.; NATH, C. ICV STZ induced impairment in memory and neuronal mitochondrial function: a protective role of nicotinic receptor. **Behav Brain Res.** 224:50–57, 2011.

SCARMEAS, N.; LUCHSINGER, J.A.; SCHUPF, N.; BRICKMAN, A.M.; COSENTINO, S.; TANG, M.X.; STERN, Y. Physical Activity, Diet, and Risk of **Alzheimer Disease**. **JAMA**, v. 302, p. 627- 637, 2009.

SCHACHTER, A. S.; DAVIS, K. L. Alzheimer's disease. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 2, n. 2, p. 91-100, Jun 2000.

SCHAEFFER, E.L; FIGUEIRÓ, M.; GATTAZ, W.F. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. **Clinics**, v. 66, p. 45-54, 2011.

SCHEFF, S.; PRICE, D.; SCHMITT, F.; MUFSON, E. Hippocampal synaptic loss in early alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 10, p. 1372–1384, 2006

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 555–563, 2011.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in alzheimer's disease. **Pharmacological Research Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 11, p. 1625–1644, 2006.

SCHMUED, L. C.; STOWERS, C. C.; SCALLET, A. C.; XU, L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res.** Feb 21;1035(1):24-31, 2005.

SCHNEIDER, J.; MURRAY, J.; BANERJEE, S.; MANN, A. EURO CARE: a cross-national study of co-resident spouse carers for people with Alzheimer's disease: I-Factors associated with carer burden. **Int. J Geriatr Psychiatry**; 14(8):651-661, 1999.

SCHUBERT, M.; BRAZIL, D. P.; BURKS, D. J.; KUSHNER, J. A.; YE, J.; FLINT, C. L.; FARHANG-FALLAH, J.; DIKES, P.; WAROT, X. M.; RIO, C.; CORFAS, G.; WHITE, M. F. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. **J. Neurosci.** 23, 7084-7092, 2003.

SELFRIEDGE, J. E.; LU, L. E. J.; SWERDLOW, R. H.. Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease. **Neurobiol. Dis.** 51, 3–12, 2013.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev**, v. 81, n. 2, p. 741-66, Apr 2001. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333

SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO molecular medicine**, 8, pp. 595-608, 2016.

SHAH, K.; DESILVA, S.; ABBRUSCATO, T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 10, p. 12629-55, Oct 03 2012.

SHANMUGANATHAN, B.; MALAR, D. S.; SATHYA, S.; DEVI, K. P. Antiaggregation potential of padina gymnospora against the toxic Alzheimer's beta-amyloid peptide 25-35 and cholinesterase inhibitory property of its bioactive compounds. **PLoS ONE**, 10(11), e 0141708, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141708>

SHANMUGANATHAN, B.; SURYANARAYANAN, V.; SATHYA, S.; NARENKUMAR, M.; SINGH, S. K.; RUCKMANI, K.; PANDIMA DEVI, K. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic effect of α -bisabolol against A β induced neurotoxicity in PC12 cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1196–1207, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.017>

SHARMA, M.; GUPTA, Y. K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sci**, v. 68, n. 9, p. 1021-9, Jan 19 2001. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205.

SHIVARAMA SHETTY, M.; SAJIKUMAR, S. 'Tagging' along memories in aging: Synaptic tagging and capture mechanisms in the aged hippocampus. **Ageing Res Rev**, v. 35, p. 22-35, May 2017.

SHOHAM, S.; BEJAR, C.; KOVALEV, E.; WEINSTOCK, M. Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol*;184(2):1043–52, 2003.

SHU, Y. AND CHECLER, F. Amyloid precursor protein, presenilins, and τ -synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Application in Alzheimer's Disease. **Pharmacol. Rev.** v. 54, p. 469-525, 2002.

SHULMAN, R. G. et al. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. **Trends Neurosci**, v. 27, n. 8, p. 489-95, Aug 2004.

SIMS-ROBINSON, C., HUR, J., HAYES, J.M., DAUCH, J.R., KELLER, P.J., BROOKS, S.V., FELDMAN, E.L. The role of oxidative stress in nervous system aging. *Plos. ONE* 8, e68011, 2013.

SINGH, N., FLETCHER, P.T., PRESTON, J.S., KING, R.D., MARRON, J.S., WEINER, M.W., JOSHI, S. Quantifying anatomical shape variations in neurological disorders. *Med. Image Anal.* 18, 616–633, 2014.

SONKUSARE, S. et al. Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. **Life Sci**, v. 77, n. 1, p. 1-14,. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205, May 20 2005.

SORIAL, M. E., & EL SAYED, N. S. E. D. 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, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1357-4>

SPIRES, T. L.; & HYMAN, B. T. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. **NeuroRx** 2, 423-37, 2005.

SPIRES-JONES , T. L.; HYMAN, B. T. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in alzheimer's disease. **NEURON**, 82, PP. 756-77, 2014..

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 26, n. 93, p. 13515-22, 1996.

STEEN, E. et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? **J Alzheimers Dis**, v. 7, n. 1, p. 63-80, Feb 2005.

STELZMANN, R. A.; NORMAN SCHNITZLEIN, H.; REED MURTAGH, F. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde" **Clinical Anatomy**, v. 8, n. 6, p. 429–431, 1995.

SUÁREZ-PEREIRA, I.; CANALS, S.; CARRIÓN, Á. M. Adult newborn neurons are involved in learning acquisition and long-term memory formation: The distinct demands on temporal neurogenesis of different cognitive tasks. **Hippocampus**, v. 25, n. 1, p. 51–61, 2015.

SULTANA, R.; BAGLIONI, M.; CECCHETTI, R.; CAI, J.; KLEIN, J. B.; BASTIANI, P.; RUGGIERO, C.; MECOCCHI, P.; BUTTERFIELD, D. A. Lymphocyte mitochondria: toward identification of peripheral biomarkers in the progression of Alzheimer disease. **Free Radic. Biol. Med.** 65, 595–606, 2013.

SUN, X.; CHEN, W. D.; & WANG, Y. D. β -Amyloid: The key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*, 6(SEP), 1–9, 2015. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00221>

SUZUKI, N. et al. High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. **Am J Pathol**, v. 145, n. 2, p. 452-60, Aug 1994.

SWAROWSKY, A.; RODRIGUES, L.; BIASIBETTI, R.; LEITE, M. C.; DE OLIVEIRA, L. F.; DE ALMEIDA, L. M. *et al.*, Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magno cellularis. **Behavioural Brain Research**, 190:206–1, 2008.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, n. 6, p. 537-46, 2001. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408

SZUTOWICZ, A.; BIELARCZYK, H.; JANKOWSKA-KULAWY, A.; PAWELCZYK, T.; RONOVSKA, A. Acetyl-coa the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 8, p. 1523–1542, 2013.

TABAK, A.G.; HERDER, C.; RATHMANN, W.; BRUNNER, E. J.; KIVIMAKI, M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. **Lancet** 379, 2279 e 2290, 2012.

TABARI, M.A.; TEHRANI, M.A.B. Evidence for the involvement of the GABAergic, but not serotonergic transmission in the anxiolytic-like effect of bisabolol in the mouse elevated plus maze. **Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.** 390, 1041–1046, 2017.

TAKEDA, S.; SATO, N.; RAKUGI, H.; MORISHITA, R. Molecular mechanisms linking diabetes mellitus and Alzheimer disease: beta-amyloid peptide, insulin signaling, and neuronal function. **Mol BioSyst** 7:1822–1827, 2011.

TAPIA-ARANCIBIA, L. *et al.* New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. **Brain Research Reviews**, v. 59, n. 1, p. 201– 220, 2008.

TEISSEIRE, P. J. *Chemistry of Fragrant Substances* (Translated by Cadby, P.A) . VCH Publishers, New York, 1994.

TERRY, R. D.; MASLIAH, E.; SALMON, D. P.; BUTTERS, N.; DETERESA, R.; HILL, R.; HANSEN, L. A.; AND KATZMAN, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. **Ann Neurol** 30, 572-80, 1991.

THORENS, B. Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. **Diabetes Obes Metab** 13(Suppl 1): 82–88, 2011.

TOMIĆ, M.; POPOVIĆ, V.; PETROVIĆ, S.; STEPANOVIĆ-PETROVIĆ, R.; MICOV, A.; PAVLOVIĆ-DROBAC, M.; & COULADIS, M. Antihyperalgesic and antiedematous activities of bisabolol-oxides-rich matricaria oil in a rat model of inflammation. **Phytotherapy Research**, 28,759– 766, 2014.

TOTA, S.; KAMAT, P.; SHUKLA, R.; NATH, C. Improvement of brain energy metabolism and cholinergic functions contributes to the beneficial effects of silibinin against streptozotocin induced memory impairment. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 207– 215, 2011.

- VENKATESAN, R.; JI, E.; KIM, S. Y. Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: A comprehensive review. **BioMed ResInt**, 2015: Article ID 814068 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/814068>.
- VERRET, L.; MANN, E.; HANG, G.; BARTH, A.; COBOS, I.; HO, K.; DEVIDZE, N.; MASLIAH, E.; KREITZER, A.; MODY, I.; MUCKE, L.; PALOP, J. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in alzheimer model. *Cell*, v. 149, n. 3, p. 708–721, 2012.
- VICENTE, E. *et al.* Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res*, v. 1251, p. 204-12, Jan 28 2009.
- VILA, R.; SANTANA, A. I.; PEREZ-ROSES, R.; VALDERRAMA, A.; CASTELLI, M. V.; MENDONCA, S.; ZACCHINO, S.; GUPTA, M. P.; CANIGUERAL, S. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampansensis*, a new source of alpha bisabolol. **Bioresour.Technol.** 101, 2510–2514, 2010.
- VILLEMAGNE, V. L. *et al.* Abeta-amyloid and Tau Imaging in Dementia. **Semin Nucl Med**, v. 47, n. 1, p. 75-88, Jan 2017.
- WALSH, D. M.; KLYUBIN, I.; FADEEVA, J. V.; CULLEN, W.K.; ANWYL, R.; WOLFE, M. S.; ROWAN, M. J.; SELKOE, D. J. Naturally secreted oligomers of amyloid b protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, **Nature**. 416, 535 e 539, 2002.
- WANG, X.; ZHENG, W.; XIE, J-W.; WANG, T.; WANG, S-L.; TENG, W-P.; WANG, Z-Y. Insulin deficiency exacerbates cerebral amyloidosis and behavioral deficits in an Alzheimer transgenic mouse model. **Mol Neurodegener** 5:46, 2010b.
- WATSON, G. S.; CRAFT, S. The role of insulin resistance in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. **CNS Drugs** 17, 27 e 45, 2003.
- WHITE, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** ;283(3):E413–E422, 2002.
- WILLETTE, A. A.; XU, G.; JOHNSON, S. C.; BIRDSILL, A. C.; JONAITIS, E. M. Insulin resistance, brain atrophy and cognitive performance in late middle-aged adults. **Diabetes Care** 36:443–449, 2013.
- WINTERS, B. D.; SAKSIDA, L. M.; BUSSEY, T. J. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neurosci. Biobehav.**, v. 32, p. 1055–1070, 2008.
- WIRZ, K.T.; KEITEL, S.; SWAAB, D.F.; VERHAAGEN, J.; BOSSERS, K. Early molecular changes in Alzheimer disease: can we catch the disease in its presymptomatic phase? **J Alzheimer's Dis.** 38 (4), 719–740, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias (Duthey B, ed). **World Health Organization**, 2013.
- WU, J.; LI, H.; SUN, X.; ZHANG, H.; HAO, S.; JI, M.; YANG, J.; LI, K. A mitochondrion-targeted antioxidant ameliorates isoflurane-induced cognitive deficits in aging mice. **PLoS One**, 10:e0138256, 2015.

XIE, H.; HOU, S.; JIANG, J.; SEKUTOWICZ, M.; KELLY, J.; BACSKAI, B. J. Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 7, p. 7904- 7909, 2013.

XU, Z.P., LI, L., BAO, J., WANG, Z.H., ZENG, J., LIU, E.J., LI, X.G., HUANG, R.X., GAO, D., LI, M.Z., ZHANG, Y., LIU, G.P., WANG, J.Z., Magnesium protects cognitive functions and synaptic plasticity in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's model. **PLoS One.** 9 (9), e108645., 2014.

YING, S.; JIN, C.; SONG, Z.; YU, X.; XIAO, C.; YU, H.; ... ZHANG, H.
Intracerebroventricular streptozotocin - induced Alzheimer ' s disease - like sleep disorders in rats : Role of the GABAergic system in the parabrachial complex, (June), 1–12, 2018.
<https://doi.org/10.1111/cns.13032>

YUE, J.; DONG, B. R.; LIN, X.; YANG, M.; WU, H. M.; WU, T. Huperzine A for mild cognitive impairment. **Cochrane Database Syst Rev** 12: CD008827, 2012. doi: 10.1002/14651858 .CD008827.pub2.

ZHAGN, L.; LI, Z. Alzheimer and the discovery of Alzheimer's disease. **Zhonghua Yi Shi Za Zhi**, 2014.

ZHANG, W.; WANG, G. M.; WANG, P. J.; ZHANG, Q.; SHA, S. H. Effects of neural stem cells on synaptic proteins and memory in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 2, p. 185-94, Feb 2014.

ZHAO, Y.; ZHAO, B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 316523, 2013.

ZHI-KUN, S.; HONG-QI, Y.; ZHI-QUAN, W.; JING, P.; ZHEN, H.; SHENG-DI, C. Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting Ab and tau, **Transl. Neurodegener.** 1, 21, 2012.

ZILKENS, R. R. *et al.* Clinical epidemiology and in-patient hospital use in the last year of life (1990-2005) of 29,884 Western Australians with dementia. **J Alzheimers Dis**, v. 17, n. 2, p. 399-407, 2009. ISSN 1387-2877.

ANEXO A



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO A-BISABOLOL EM UM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**", protocolo nº39/2017, sob responsabilidade da Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião realizada em 25 de maio de 2017.

| | |
|---------------------|-------------------------------|
| Vigência do projeto | 03/07/2017 a 20/02/2019 |
| Espécie/Linhagem | Camundongo heterogênico Swiss |
| Nº de Animais | 120 |
| Peso/Idade | 25-35g - 06 semanas |
| Sexo | Machos |
| Origem | Biotério Central da UFC |

Fortaleza, 26 de maio de 2017

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

ALEXANDRE HAVT BINDÁ

COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1600002