

Afonso Kopczynski de Carvalho, Luiz Valmor Cruz Portela  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

## INTRODUÇÃO

A sinalização de insulina no cérebro, mais especificamente no hipocampo, vem sendo considerada uma via chave na sinalização e processamento do aprendizado e memória. No envelhecimento e em doenças neurodegenerativas essa sinalização apresenta prejuízos, sendo esse fenômeno denominado resistência à sinalização cerebral de insulina.

Os mecanismos que permeiam a neurodegeneração e o déficit cognitivo no envelhecimento cerebral envolvem essa resistência e neuroinflamação crônica. A microglia é uma organela que tem como uma de suas funções mediar sinalizações neuroinflamatórias, essas cascatas muitas vezes são dependentes das proteínas COX-2 e  $\text{nf-}\kappa\text{-}\beta$ .

Na neuroinflamação crônica ocorre a liberação de estímulos pró-inflamatório a longo prazo pela microglia, sendo esses estímulos fatores causadores de processos neurodegenerativos tanto no envelhecimento cerebral quanto em processos patológicos. Assim, o objetivo do presente estudo é investigar qual a relação dos efeitos da sinalização de insulina sobre a neuroinflamação, no hipocampo, bem como seus efeitos sobre o processamento da memória espacial de animais jovens e velhos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Desenho experimental (Fig. 1. Desenho experimental):** dois protocolos distintos foram utilizados, no primeiro, a eutanásia ocorreu 24 horas após o término do tratamento, enquanto no segundo, após o mesmo tratamento, os animais foram submetidos a análise comportamental antes da eutanásia.

**Tratamento:** salina (controle) e insulina (20mU).

**Animais:** Ratos Wistar jovens (4meses) e velhos (22meses).

**Cânulação intra cerebral ventricular (icv):** cirurgia estereotáxica com as seguintes coordenadas em relação ao bregma: 2,5mm lateral, 1mm anterior e 3,5mm de profundidade; foram utilizadas cânulas de 10mm.

**Labirinto aquático de morris (WM. do inglês *water maze*):** foram realizados 7 dias de treinamento previos ao dia do teste com o intuito de avaliar o aprendizado e memória espacial (Fig. 2. Desenho ilustrativo do WM)

**Imunohistoquímica:** foram utilizados Iba-1 e CD68 como marcadores de ativação microglial nas regiões CA1, CA3 e GD (giro dentado) do hipocampo, as imagens foram submetidas a análise microscópica confocal.

**Western blot:** quantificamos a expressão hipocampal de COX-2 e a relação  $\text{nf-}\kappa\text{-}\beta/\text{p-nf-}\kappa\text{-}\beta$ .

Para as análises estatísticas foi utilizado um  $p < 0,05$ .

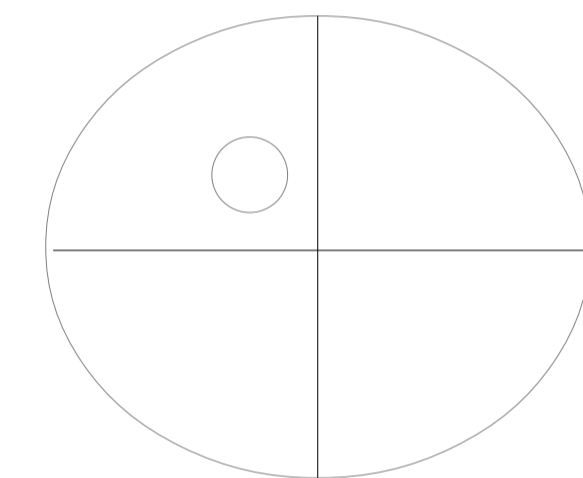
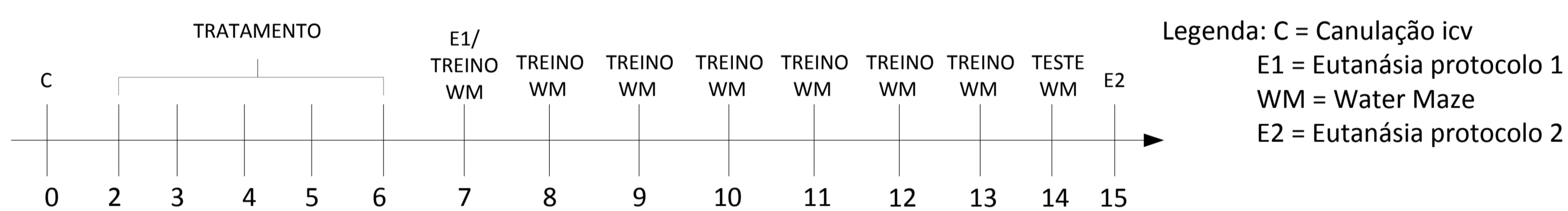


Fig. 2. Desenho ilustrativo do WM.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

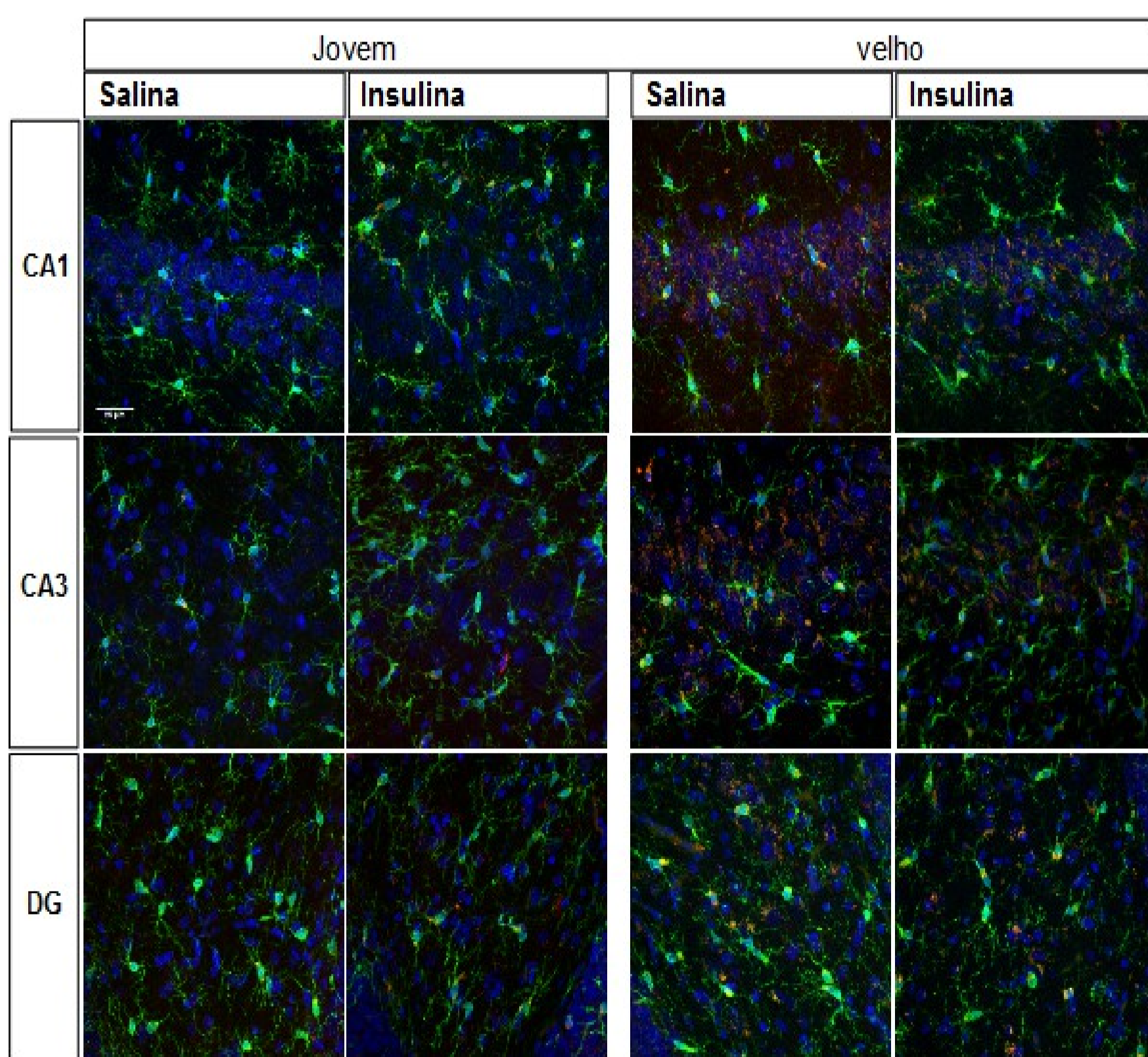


Fig. 3. Imagens, de microscopia confocal, representativas da imunohistoquímica utilizando DAPI, Iba-1 e CD68 para a análise de ativação microglial.

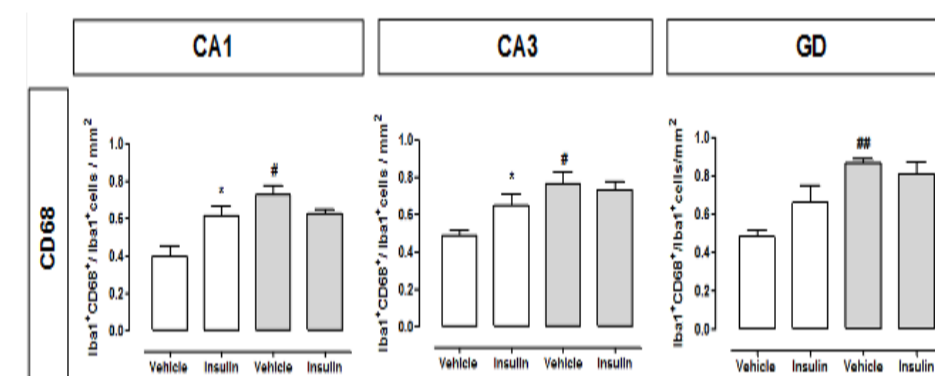


Fig. 5. Quantificação das imagens, imunohistoquímicas, de CD68, analisando sua colocalização com Iba-1 para determinar ativação microglial. ( $p < 0,05$ )

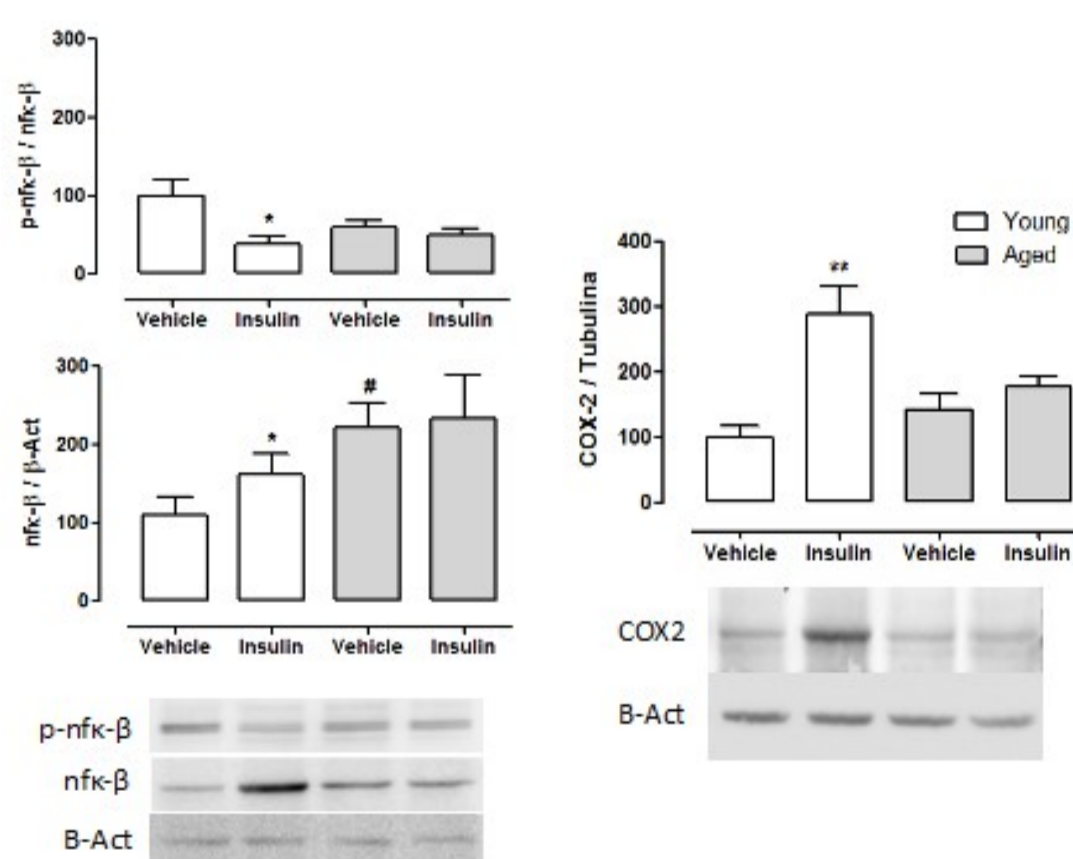


Fig. 6. Análise, por western blot da expressão de COX-2 e a relação  $\text{nf-}\kappa\text{-}\beta/\text{p-nf-}\kappa\text{-}\beta$ , para verificação de marcadores de neuroinflamação nos animais 24 horas após o final do tratamento. ( $p < 0,05$ )

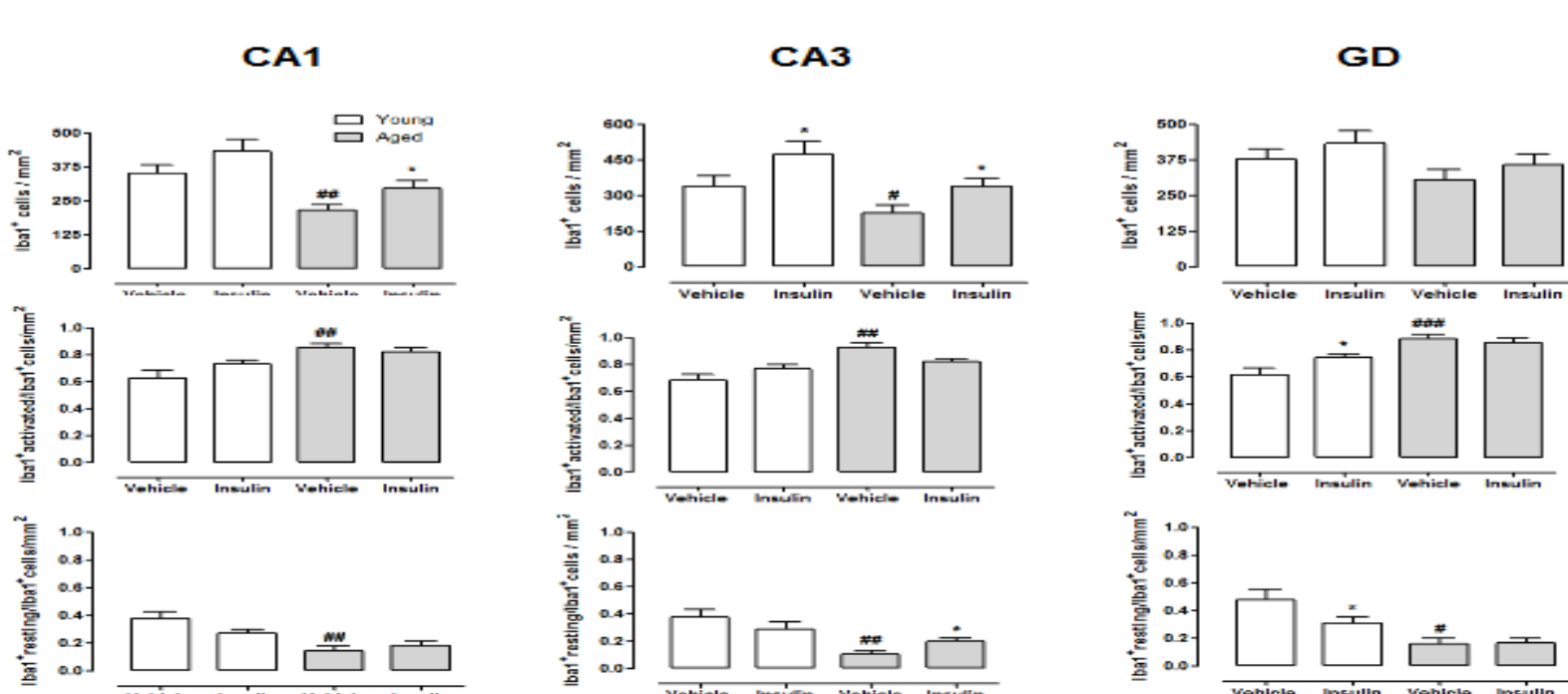


Fig. 4. Quantificação de Iba-1 das imagens da imunohistoquímica, analisando morfologicamente a quantidade total de microglias, ativação e inativação microgliais nas regiões alvo do hipocampo ( $p < 0,05$ )

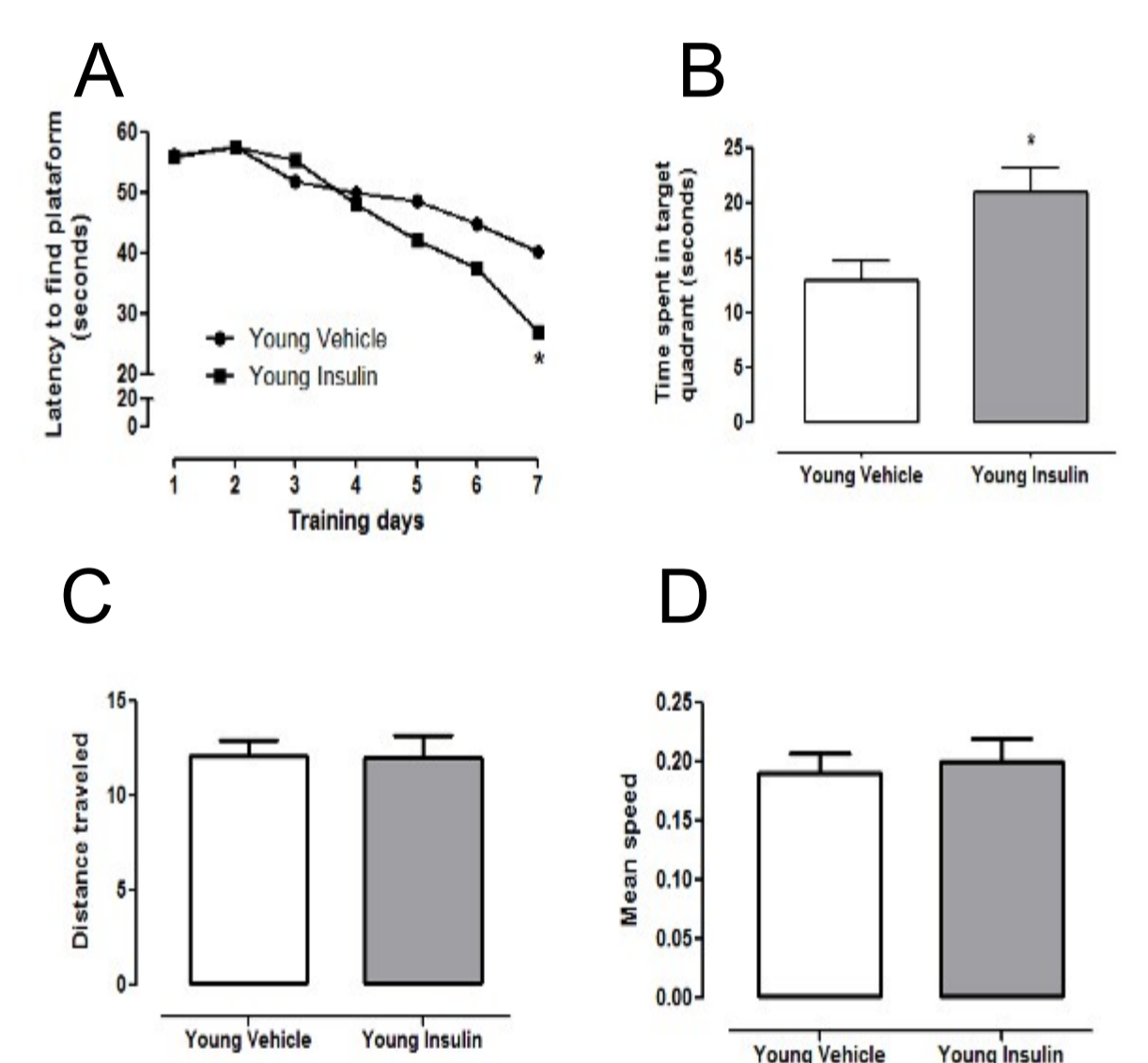


Fig. 8. Resultados representativos do WM realizado com os animais jovens, mostrando a melhora da memória espacial dos animais tratados com insulina. (A) Tempo para encontrar a plataforma durante os dias de treino. (B) Tempo no quadrante alvo durante o teste. (C) Distância percorrida no teste. (D) Média da velocidade do nado durante o teste. ( $p < 0,05$ )

A partir desses resultados é possível concluir que provavelmente existe uma sinalização neuroinflamatória da insulina, em animais jovens, que contribui para o processamento da memória espacial. No envelhecimento cerebral essa via parece estar comprometida, sendo a sinalização neuroinflamatória de insulina uma via de sinalização a ser explorada no processamento da memória no cérebro normal, durante o envelhecimento ou no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Apoio: