

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Vitor Gayger Dias

**AVALIAÇÃO DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM RATOS WISTAR
SUBMETIDOS AO MODELO DE DEMÊNCIA TIPO ALZHEIMER E EFEITO DA
EXENDINA-4 NA NEUROPROTEÇÃO**

Porto Alegre

2021

Vitor Gayger Dias

**AVALIAÇÃO DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM RATOS WISTAR
SUBMETIDOS AO MODELO DE DEMÊNCIA TIPO ALZHEIMER E EFEITO DA
EXENDINA-4 NA NEUROPROTEÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Gayger Dias, Vitor
AVALIAÇÃO DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA EM RATOS
WISTAR SUBMETIDOS AO MODELO DE DEMÊNCIA TIPO ALZHEIMER
E EFEITO DA EXENDINA-4 NA NEUROPROTEÇÃO / Vitor Gayger
Dias. -- 2021.
48 f.
Orientador: Carlos Alberto Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Doença de Alzheimer. 2. Barreira
Hematoencefálica. 3. Barreira Hematolíquórica. 4.
Exendina-4. 5. STZ. I. Gonçalves, Carlos Alberto,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Aos meus pais Marilene e Flávio, pelo carinho, amor e dedicação com que me criaram e por sempre depositarem confiança em mim.

A minha esposa e colega de laboratório Vanessa, pelo apoio, companheirismo e profissionalismo.

Ao meu irmão Bruno, pela parceria e amizade durante toda minha vida.

Aos meus sogros e cunhadas, por não me deixarem desistir, sempre me apoiando e motivando.

Ao meu orientador Carlos Alberto Gonçalves “CA”, por me aceitar no laboratório, por proporcionar essa experiência única, por ser além de orientador, um psicólogo, amigo e pai.

Aos meus queridos colegas de laboratório, principalmente ao “Embustedo”, pela colaboração, amizade, conhecimento e confiança que me foram passados.

Ao pessoal da secretaria, em especial Giordano, Cléia e Douglas, que nos auxiliam de todas as maneiras possíveis, inclusive fora de horário de trabalho.

Aos funcionários da portaria e da limpeza, que fazem um trabalho importantíssimo, sempre com um sorriso no rosto, em especial a Silvana, que alegra nossas manhãs.

A todos que de uma forma ou outra colaboraram com a ciência, tornando o conhecimento uma chave contra o obscurantismo.

Ao meu eterno presidente Luís Inácio Lula da Silva, por através do PROUNI permitir minha graduação, sendo um dos muitos filhos de família pobre beneficiados pelo programa.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS, pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

“O conhecimento nos faz responsáveis”.

Che Guevara

Índice

| | |
|---|----|
| PARTE I | 1 |
| 1 INTRODUÇÃO | 5 |
| 1.1 Doença de Alzheimer..... | 5 |
| 1.1.1 Estreptozotocina | 7 |
| 1.2 Barreira Hematoencefálica | 7 |
| 1.2.1 Albumina | 8 |
| 1.2.2 Claudinas | 8 |
| 1.2.3 Aquaporinas | 8 |
| 1.2.4 Kir 4.1 | 9 |
| 1.2.5 GLUT-1 | 10 |
| 1.3 GLP-1 e Exendina-4 | 10 |
| 2 OBJETIVOS | 12 |
| 2.1 Objetivo Geral | 12 |
| 2.2 Objetivos específicos | 12 |
| PARTE II | 13 |
| 3 METODOLOGIA..... | 14 |
| 3.1 Animais | 14 |
| 3.2 Grupos experimentais..... | 14 |
| 3.3 Desenho Experimental..... | 15 |
| 3.4 Indução do Modelo de Alzheimer Esporádico..... | 15 |
| 3.5 Tratamento | 16 |
| 3.6 Teste Comportamental | 16 |
| 3.7 Anestesia, Eutanásia e Coleta de Amostras | 17 |
| 3.8 Captação de Glicose | 17 |
| 3.9 Western Blotting | 18 |

| | |
|--|----|
| 3.10 Dosagem de Albumina no Líquor | 19 |
| 3.11 Dosagem de Albumina no Soro | 20 |
| 3.12 Análise estatística | 20 |
| 4 RESULTADOS | 21 |
| 4.1 EX-4 reverte déficit cognitivo induzido por STZ | 21 |
| 4.2 EX-4 reverte diminuição da captação de glicose 4 semanas após infusão de STZ | 22 |
| 4.3 Conteúdo de albumina líquórica e sérica não foram alterados | 23 |
| 4.4 STZ diminui os níveis de Claudina-2 no hipocampo de ratos Wistar 4 semanas após infusão ICV | 24 |
| 4.5 STZ não altera homeostase hídrica e iônica em modelo de DA _e | 25 |
| PARTE III | 26 |
| 5 DISCUSSÃO | 27 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 31 |
| 7 PERSPECTIVAS | 32 |
| 8 APOIO FINANCEIRO | 33 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |

PARTE I

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva associada a uma variedade de sintomas neuropsiquiátricos e comportamentais. A análise de tecido cerebral de pacientes com DA revela lesões características como acúmulo do peptídeo β -amiloide, emaranhados neurofibrilares e gliose. O sistema nervoso central (SNC) é seletivamente permeável a moléculas, essa seletividade se deve a presença da barreira hematoencefálica (BHE) e da barreira hematoliquórica (BHL). Estas barreiras possuem um complexo de junções oclusivas, que inibem a difusão paracelular de moléculas. Diversos estudos têm demonstrado que o acúmulo do peptídeo β -amiloide pode comprometer a integridade da BHE resultando em neurodegeneração. Alterações na permeabilidade das barreiras são acompanhadas de mudanças na expressão de proteínas específicas como aquaporinas, claudinas, e Kir 4.1. Entretanto, pouco se sabe sobre as barreiras no modelo de demência induzido com estreptozotocina (STZ), cujas alterações precedem o acúmulo do peptídeo β -amiloide. Pacientes com DA apresentam elevado estresse oxidativo e hipometabolismo da glicose encefálica, possivelmente pelo prejuízo na sinalização da insulina cerebral. Portanto, drogas utilizadas no tratamento do diabetes são sugeridas como benéficas nos casos de DA. Os agonistas dos receptores do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1Rs) já demonstraram ter efeitos neuroprotetores na patologia da DA. A Exendina-4 (EX-4), uma destas drogas, também já demonstrou ter efeito protetor na funcionalidade da BHE em casos de diabetes mellitus e traumatismo crânio encefálico, no entanto, seu papel nos prováveis danos na BHE causados pela DA não estão estabelecidos. Neste trabalho, analisamos que prejuízos cognitivos e do metabolismo da glicose no modelo de demência induzido por STZ são revertidas pela EX-4. Observamos que os parâmetros de BHE não são alterados até 4 semanas, mas que a BHL se mostra comprometida em 4 semanas. Demonstramos que a relação entre DA e metabolismo da glicose é muito estreita, havendo melhora significativa em diversos parâmetros bioquímicos a partir do uso de EX-4, fortalecendo o potencial dos agonistas do GLP-1R como alternativa terapêutica para DA.

Palavras chave: Doença de Alzheimer, Barreira Hematoencefálica, Barreira Hematoliquórica, Exendina-4, STZ.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease associated with a variety of neuropsychiatric and behavioral symptoms. Analysis of brain tissue from AD patients reveals characteristic lesions such as β -amyloid peptide accumulation, neurofibrillary tangles and gliosis. The central nervous system (CNS) is selectively permeable to molecules, this selectivity is due to the presence of the blood-brain barrier (BBB) and the blood-cerebrospinal barrier (BCSFB). These barriers have a complex of tight junctions, which inhibit the paracellular diffusion of molecules. Several studies have shown that the accumulation of β -amyloid peptide can compromise the integrity of the BBB, resulting in neurodegeneration. Changes in barrier permeability are accompanied by changes in the expression of specific proteins such as aquaporins, claudins, and Kir 4.1. However, little is known about the barriers in the model of streptozotocin-induced (STZ-induced) dementia, whose alterations precede the accumulation of β -amyloid peptide. AD patients have high oxidative stress and brain glucose hypometabolism, possibly due to impaired brain insulin signaling. Therefore, drugs used to treat diabetes are suggested as beneficial in AD cases. Glucagon-like peptide receptor agonists (GLP-1Rs) have been shown to have neuroprotective effects in AD pathology. Exendin-4 (EX-4), one of these drugs, has also been shown to have a protective effect on the functionality of the BBB in cases of diabetes mellitus and traumatic brain injury, however, its role in the probable damage to the BBB caused by AD has not been established. In this work, we analyze that cognitive and glucose metabolism impairments in the STZ-induced dementia model are reversed by EX-4. We observed that the BBB parameters are not changed up to 4 weeks, but that the BCSFB is compromised within 4 weeks. We demonstrate that the relationship between AD and glucose metabolism is very close, with significant improvement in several biochemical parameters from the use of EX-4, strengthening the potential of GLP-1R agonists as a therapeutic alternative for AD.

Key words: Alzheimer's Disease, Blood Brain Barrier, Blood Cerebrospinal Fluid Barrier, Exendin-4, STZ.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| AQPs | Aquaporinas |
| APP | Proteína Precursora Amiloide |
| BDNF | Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro |
| BHE | Barreira Hematoencefálica |
| BHL | Barreira Hematoliquórica |
| DA | Doença de Alzheimer |
| DA _e | DA Esporádica |
| DA _f | DA Familiar |
| DM | Diabetes Mellitus |
| EX-4 | Exendina-4 |
| GLP-1 | Peptídeo Semelhante ao Glucagon |
| GLP-1R | Receptores do Peptídeo Semelhante ao Glucagon |
| GLUT-1 | Transportador de Glicose |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alto Desempenho |
| ICV | Intracerebroventricular |
| IP | Intraperitoneal |
| IR | Índice de Reconhecimento |
| LCR | Líquido Cefalorraquidiano |
| RO | Reconhecimento de Objetos |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| STZ | Estreptozotocina |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita inicialmente em 1906, pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer. Em 1901 no Asilo de Frankfurt, Alzheimer tratou uma paciente de 51 anos que apresentava perda progressiva de memória. O quadro agravou e ela faleceu 5 anos depois. Na autópsia, notou que o córtex cerebral da paciente parecia atrofiado, com aumento dos sulcos. Ele também identificou alterações histopatológicas, que viriam a ser conhecidas como marcadores importantes da condição degenerativa que atualmente leva o nome de Alzheimer ¹.

A DA é uma doença neurodegenerativa caracterizada por perda neurológica progressiva associada a uma variedade de sintomas neuropsiquiátricos e comportamentais, especialmente perdas cognitivas, déficit de memória, deterioração da linguagem e prejuízo da convivência social ²⁻⁴.

Histopatologicamente a DA é caracterizada por perda sináptica e morte neuronal, principalmente nas regiões cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex entorrinal e o estriado ventral. As principais características encontradas em encéfalos de pacientes portadores de DA incluem acúmulo de placas β -amiloide localizados no espaço extracelular, principalmente nas paredes dos vasos sanguíneos, acúmulo de filamentos anormais da proteína tau hiperfosforilada com consequente formação de emaranhados neurofibrilares no espaço intracelular, ativação da glia, aumento de estresse oxidativo e neuroinflamação ⁵⁻⁷.

Outras alterações cerebrais incluem os processos de neuroinflamação e atrofia. Sabe-se que o acúmulo de β -amiloide e proteína tau ativam a microglia. Estas células tentam eliminar as proteínas tóxicas, bem como os restos disseminados de células mortas. Quando a microglia não consegue acompanhar tudo o que precisa ser eliminado, seus esforços passam a ser insuficientes, gerando um processo de neuroinflamação crônica. A atrofia ou encolhimento encefálico ocorre devido à grande perda de células e a função cerebral é ainda mais agravada por diminuições na capacidade do cérebro de metabolizar a glicose, sua principal fonte de energia ⁸.

A DA pode ser desenvolvida de duas formas distintas, a DA familiar (DA_f) e a DA esporádica (DA_e). A DA_f é uma doença autossômica dominante com início antes dos 60 anos. A primeira mutação causadora da DA_f a ser identificada foi no gene da proteína precursora de amiloide (APP) no cromossomo 21, entretanto mutações nos genes altamente homólogos da presenilina-1 e da presenilina-2 são responsáveis pela maioria dos casos de DA_f. Apesar disso, a forma familiar da doença é rara, com prevalência abaixo de 0,1%. A DA_e é a forma mais comum, sendo responsável por mais de 95% dos casos de DA, caracterizada por um início mais tardio (acima de 60 anos) por falha na eliminação e consequente acúmulo de peptídeo β -amiloide nos tecidos cerebrais ⁹.

Diversos fatores de risco estão associados com o desenvolvimento de demência e DA_e. Dentre eles podemos citar o diabetes mellitus (DM), hipertensão, tabagismo e obesidade, por exemplo. Um dos fatores de destaque é o DM, pois o desenvolvimento da demência está intimamente relacionado ao metabolismo da glicose ^{10,11}.

Dentre as alterações bioquímicas e moleculares na DA, podemos destacar o hipometabolismo da glicose e a diminuição da expressão do Transportador de Glicose I (GLUT-1) na Barreira Hematoencefálica (BHE). Estes fatores levantam questões opostas: as alterações na BHE ocorrem devido a diminuição da demanda de glicose por um cérebro disfuncional; ou o cérebro é disfuncional na DA porque a BHE não está fornecendo quantidades adequadas de glicose, modificando o metabolismo do Sistema Nervoso Central (SNC) ^{12,13}.

Em 2015, a DA afetava cerca de 47 milhões de pessoas ao redor do mundo (cerca de 5% da população idosa mundial) e as estimativas apontam que este número deve aumentar para 75 milhões em 2030 e 132 milhões em 2050. Estudos recentes apontam que globalmente quase 9,9 milhões de pessoas desenvolvem DA a cada ano.² No Brasil, a estimativa em 2009 era de que existiam cerca de 1,1 milhões de pessoas com DA, mas estes dados possivelmente estavam subnotificados, devido a problemas de diagnóstico ¹⁴.

1.1.1 Estreptozotocina

Existem diversos modelos animais para estudar e compreender a DA. Um dos modelos não-transgênicos bem estabelecido na literatura é obtido através de injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ). A STZ é uma droga com ação antibiótica experimentalmente utilizada para indução de DM tipo I, devido à sua ação tóxica para as células β -pancreáticas, prejudicando a síntese de insulina ^{15,16}.

Quando administrada no SNC, em pequenas doses, se estabelece um modelo relevante de disfunção cerebral crônica, caracterizada por déficits progressivos e de longo prazo na aprendizagem, memória e comportamento cognitivo. Alterações bioquímicas encontradas no modelo STZ, mimetizando a DA, são de extrema importância para compreensão dos mecanismos desta doença ¹⁷⁻²⁰.

1.2 Barreira Hematoencefálica

O SNC é seletivamente permeável às moléculas presentes no sangue, principalmente pela presença da BHE. Esta barreira possui um complexo de junções oclusivas que inibem a difusão paracelular de moléculas ²¹. As junções oclusivas são formadas por um complexo proteico transmembrana. Dentre as várias proteínas deste complexo estão as ocludinas e as claudinas ^{21,22}.

Outro componente importante na estrutura da BHE são os astrócitos, que participam ativamente do controle homeostático e do transporte de substâncias através do SNC. Os astrócitos são células em formato de estrela, cujos prolongamentos formam uma rede de lamelas próximas ao endotélio da BHE, controlando o tônus vascular. Os podócitos astrocitários estão intimamente ligados a superfície externa dos capilares sanguíneos, separando os capilares dos neurônios. Durante o desenvolvimento, os astrócitos guiam neurônios e direcionam os capilares da BHE, possuindo ainda papel na indução e manutenção do fenótipo da BHE ^{23,24}.

A permeabilidade da BHE pode ser alterada em eventos patológicos do SNC. Diversos estudos têm demonstrado que o acúmulo do peptídeo beta amiloide pode comprometer a integridade da BHE, desregulando a homeostase encefálica e podendo resultar em neurodegeneração. Alterações na permeabilidade da BHE são acompanhadas de mudanças na expressão de proteínas específicas como

aquaporinas, claudinas, e Kir 4.1, além de extravasamento para o SNC de proteínas derivadas do sangue como a albumina ^{16,25-28}.

1.2.1 Albumina

Proteínas derivadas do sangue comumente são utilizadas como biomarcadores de permeabilidade da BHE. Uma destas proteínas é a albumina. Um aumento na proporção desta proteína no líquido cefalorraquidiano (LCR) em relação aos níveis séricos, é usado como uma medida da funcionalidade da BHE. Diversos estudos relataram níveis elevados de albumina em pacientes e em modelos animais de DA ²⁹.

1.2.2 Claudinas

As claudinas são uma família de proteínas integrais de membrana que juntamente com as ocludinas formam as junções oclusivas. Estas proteínas possuem entre 21 a 28 kDa, quatro domínios transmembrana, duas porções extracelulares e domínios citoplasmáticos carboxi e amino terminal com uma porção intracelular curta. As porções extracelulares ligam-se com claudinas adjacentes das células endoteliais, formando a vedação primária das junções oclusivas. O principal papel das claudinas é a regulação da seletividade paracelular quanto a íons pequenos. A claudina-5 é a mais abundante das proteínas transmembrana no SNC e um regulador crítico na permeabilidade através da BHE. Outro membro importante da família das claudinas é a claudina-2, que está presente nas junções oclusivas do plexo coroide, agindo como canal paracelular para água e pequenos íons através da Barreira Hematoliquórica (BHL) ^{16,30-32}.

1.2.3 Aquaporinas

As aquaporinas (AQPs) representam uma família de proteínas de membrana que realizam um crítico controle hídrico, algumas das AQPs também permitem o transporte de ânions, solutos voláteis (CO₂) e amônia. Existem 13 tipos de AQPs, destas apenas seis foram descritas no SNC (AQP 1, 3, 4, 5, 8 e 9), distribuindo-se

pelo plexo coroide (AQP1), astrócitos (AQP 1, 3, 4, 5, 8 e 9), oligodendrócitos (AQP8), células endoteliais (AQP 1, 4 e 9) e neurais (AQP 1, 5 e 8) ³³⁻³⁵.

A AQP1 é encontrada nas células epiteliais do plexo coroide, desempenhando um papel crucial na produção de LCR. Esta proteína também foi encontrada em neurônios sensoriais de pequeno diâmetro no corno dorsal da medula espinhal e gânglios trigêmeos e nodosos. Além disso, as respostas de dor estão diminuídas em animais com expressão reduzida de AQP1, uma forte indicação de que ela pode estar envolvida na sinalização da dor ^{35,36}.

A AQP4 é a principal AQP do SNC em mamíferos, recobre quase 95% da superfície dos capilares da BHE, permitindo um fluxo bidirecional de água entre os tecidos encefálicos e os vasos sanguíneos ³⁵⁻³⁷. Foi sugerido que a despolarização dos canais de AQP4 que revestem a BHE levam à progressão acelerada da DA. Estudos realizados em camundongos transgênicos com superexpressão de β -amiloide mostraram que a deleção de AQP4 aumenta significativamente a formação de placas, implicando em aumento do comprometimento cognitivo e motor. Diversos grupos afirmam que a depuração do LCR depende da expressão de AQP4 nos astrócitos, embora este mecanismo ainda não seja esclarecido. Evidências cumulativas indicam que a AQP4 afeta o início e a progressão da DA por meio de vários mecanismos, como depuração de β -amiloide, sinalização do glutamato, plasticidade sináptica, sinalização de Ca^{2+} , neuroinflamação e secreção de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). Todas estas evidências apontam a AQP4 como um alvo promissor para a prevenção e o tratamento da DA ^{35,38}.

1.2.4 Kir 4.1

A homeostase iônica é muito importante para o funcionamento do SNC. O controle de potássio (K^+), é essencial para a excitabilidade neural adequada, estando intimamente ligado a mecanismos de volume hídrico encefálico. A captação de K^+ pelas células gliais ocorre principalmente por canais internos de K^+ , conhecidos como Kir. A família de canais Kir está dividida em sete subfamílias (Kir 1.0 – Kir 7.0), os quais possuem mais de vinte integrantes. O canal de potássio Kir 4.1 é responsável pela manutenção do potencial de repouso celular. Em astrócitos a expressão do Kir

4.1 está ligada tanto à fenda sináptica quanto aos vasos sanguíneos, realizando o tamponamento de K^+ e regulando os níveis deste íon no SNC ³⁹⁻⁴¹.

1.2.5 GLUT-1

O SNC é altamente dependente de glicose, principalmente para fornecimento de energia aos neurônios. O passo inicial para o metabolismo glicolítico cerebral, depende da passagem de glicose através das membranas. Devido às suas características de molécula polar e hidrofílica, ela necessita de transportadores específicos. Uma das famílias de transportadores de glicose mais abundantes no SNC é a dos transportadores de glicose independentes de sódio (GLUT), que permitem a passagem de glicose e moléculas semelhantes de forma uniporte. A expressão dos diferentes membros da família GLUT (GLUT 1-14) são tecido-específicas. Um dos membros mais importantes e abundantes no SNC é o GLUT-1, que está presente tanto na BHE quanto em astrócitos. Devido a sua alta expressão na BHE, é o principal responsável pelo transporte de glicose dos vasos para os tecidos cerebrais. Diversos estudos mostram a diminuição na expressão de GLUT-1 em modelos de DA, bem como a correlação dessa diminuição com o aumento de deposição de β -amiloide e de proteína tau, tornando-se um potencial alvo terapêutico para DA ⁴².

1.3 GLP-1 e Exendina-4

Devido ao hipometabolismo da glicose e prejuízo na sinalização da insulina cerebral observadas na DA, agonistas do receptor GLP-1, drogas bem estabelecidas para o tratamento de Diabetes Mellitus tipo II (DM tipo II), apresentam efeito neuroprotetor sobre essas alterações, pois sabe-se que elas estimulam a produção e secreção de insulina, a partir de um mecanismo dependente de glicose ^{16,43}.

O Peptídeo Semelhante ao Glucagon-1 (GLP-1) é um hormônio peptídico que aumenta a secreção de insulina e diminui a secreção de glucagon no pâncreas de maneira dependente da glicose. O efeito do hormônio GLP-1 tem limitado valor farmacológico, devido a sua curta estabilidade, de 1 a 2 minutos. Portanto, análogos mais estáveis têm sido desenvolvidos, possuindo efeito mais longo em relação ao do GLP-1, sendo conhecidos como agonistas dos receptores de GLP-1 (GLP-1R) ⁴⁴⁻⁴⁶.

Atualmente, cinco agonistas de GLP-1R são aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em humanos, são estes: a Exenatida ou Exendina-4 (EX-4), a Liraglutida, a Lixisenatida, a Albiglutida e a Dulaglutida. A EX-4 foi o primeiro análogo GLP-1 de ação longa descrito, aprovado para comercialização, sendo utilizada para o tratamento do DM tipo II. Esta substância é extraída do veneno de um lagarto encontrado na América do Norte, conhecido como Monstro de Gila (*H. suspectum*), e apresenta uma estabilidade consideravelmente maior (120 minutos) que o GLP-1 (na casa de segundos), viabilizando sua utilidade farmacêutica. Os análogos do GLP-1 atravessam a BHE, propriedade que é de vital importância para utilização no tratamento de desordens neurodegenerativas. Existem diversos resultados positivos na reversão de danos da DA por agonistas de GLP-1R ^{16,47-50}.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar, em modelo animal de demência do tipo DA_e induzido por infusão ICV de STZ, as alterações na BHE, em hipocampo, líquido e soro de ratos Wistar machos adultos, bem como verificar o papel protetor da EX-4 quanto à função cognitiva e o possível dano na BHE.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a função cognitiva em animais submetidos ao modelo de demência do tipo DA_e induzido por STZ tratados com EX-4 através de teste comportamental.

Analisar a captação de glicose e quantificação das proteínas constituintes da BHE em modelo de demência do tipo DA_e induzido por STZ tratados com EX-4.

Observar a partir da quantificação de albumina no líquido e soro a integridade e a permeabilidade da BHE em modelo de demência do tipo DA_e induzido por STZ tratados com EX-4.

PARTE II

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 90 dias de idade (peso: 266g – 383g), provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em ciclo de 12h/12h claro e escuro, a temperatura constante de 22°C ± 2°C, com livre acesso a comida e água, foi utilizada a dieta padrão do biotério. Os animais foram alojados em caixas de polietileno (410 x 340 x 160 mm; 1394 cm²), em cama de maravalha de pinus selecionada e autoclavada. A manipulação e tratamento dos animais respeitaram as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, além da legislação federal preconizada pela Lei Arouca (lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008) com aprovação do CEUA sob o protocolo 37479.

3.2 Grupos experimentais

Os ratos foram divididos aleatoriamente em caixas contendo 4 animais, todas as caixas possuíam um animal de cada grupo experimental. Os grupos foram nomeados de acordo com o procedimento cirúrgico e com o tratamento aplicado, formando os seguintes: SHAM, SHAM+EX, STZ, STZ+EX (Tabela 1). Além dos grupos, foram realizados os mesmos procedimentos para dois diferentes tempos experimentais, de 2 e 4 semanas (Figura 1).

| Tempo Experimental | Cirurgia Estereotáxica | Tratamento |
|--------------------|------------------------|------------|
| 2 Semanas | SHAM | Salina |
| | | EX-4 |
| | STZ | Salina |
| | | EX-4 |
| 4 Semanas | SHAM | Salina |
| | | EX-4 |
| | STZ | Salina |
| | | EX-4 |

Tabela 1: Grupos experimentais. Fonte: Própria autoria.

3.3 Desenho Experimental

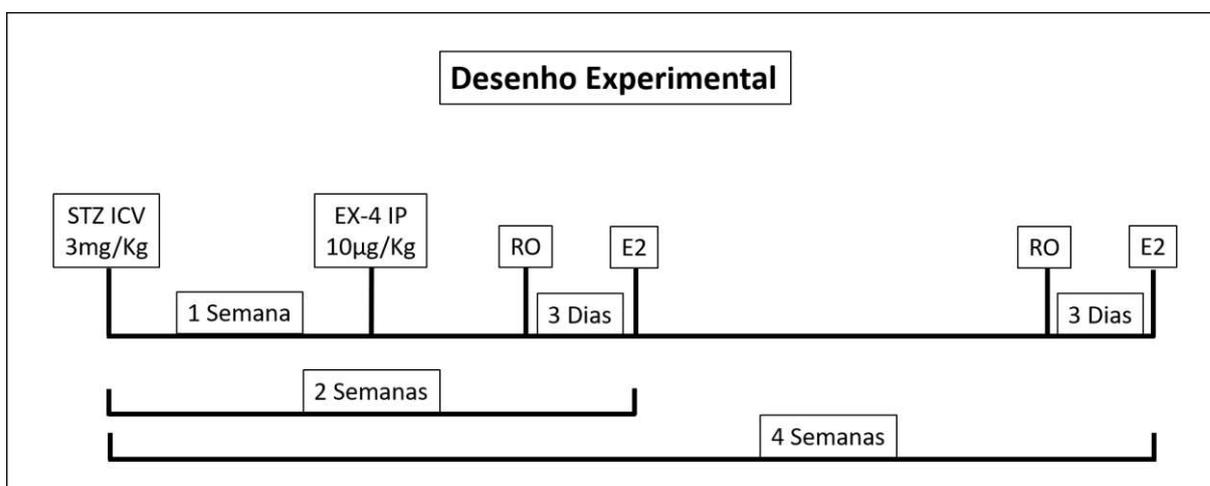


Figura 1 Desenho experimental. STZ: Estreptozotocina. ICV: Intracerebroventricular. EX-4: Exendina-4. IP: Intraperitoneal RO: Teste de Reconhecimento de Objetos. E2: Eutanásia experimental.

3.4 Indução do Modelo de Alzheimer Esporádico

Para indução do modelo animal de DA do tipo esporádico, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (IP) de Cetamina (75 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg). Neste protocolo de anestesia utilizamos a Xilazina por seu efeito de potencializar as drogas anestésicas, sendo um potente hipnótico não narcótico tranquilizante agonista adrenérgico, com propriedades de relaxamento muscular que usualmente é aplicada em conjunto com a Cetamina, que possui caráter anestésico, induzindo estado de sedação, imobilidade e analgesia. Após a confirmação da anestesia, os animais foram posicionados no aparelho estereotático para a realização do procedimento cirúrgico. Uma incisão vertical de aproximadamente 2cm foi feita na cabeça dos animais para acesso ao Bregma. O aparelho estereotático foi posicionado sobre o Bregma para localização das coordenadas (-0,09mm no sentido antero-posterior, $\pm 0,15$ mm no sentido latero-lateral, -0,36mm no sentido dorso ventral), o sentido latero-lateral foi marcado em ambos os lados, para acesso bilateral, e, para acesso às coordenadas dorso-ventral foi realizada perfuração do crânio utilizando broca. Após atingir o local das coordenadas do 3º ventrículo, como previamente descrito em 2009 por Rodrigues e colaboradores ¹⁸, foram injetados 5µL de solução em cada hemisfério contendo 3mg/Kg de STZ ou veículo, de acordo com o grupo. Foi realizada a sutura da incisão e os animais mantidos sob aquecimento até recuperação

da anestesia. Posteriormente, os animais ficaram alojados por 1 semana na sala de pós cirúrgico do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para recuperação do procedimento.

3.5 Tratamento

Uma semana após o procedimento cirúrgico, foi iniciado o tratamento. Cada animal recebeu uma dose diária de 200µL IP, contendo salina ou solução com 10µg/Kg de EX-4, conforme o grupo experimental. O tratamento foi aplicado uma vez ao dia, sempre entre às 12h e 14h, durante 1 ou 3 semanas, de acordo com o protocolo.

3.6 Teste Comportamental

O teste comportamental utilizado foi a tarefa de Reconhecimento de Objetos (RO), um teste simples de memória que depende principalmente do comportamento exploratório inato do roedor. A tarefa foi realizada em três etapas: habituação, treino e testes (Figura 2). Todas as etapas foram realizadas durante o período ativo dos animais, em aparato de campo aberto com dimensões de 50cmx50cm. Os animais ficaram em aclimatação na sala por 1h antes do início de cada etapa do experimento.

No primeiro dia foi realizada a habituação, onde o animal foi colocado de costas para o centro do aparato para exploração durante 10 minutos. No segundo dia, para a realização do treino, dois objetos idênticos (objeto A) foram colocados em diagonal na zona periférica do aparato, para o animal explorá-los por 5 minutos. Após uma hora, foi realizado o teste de memória de curta duração, no qual um dos objetos A foi trocado por um novo objeto (objeto B), mantendo-se a posição anterior, com tempo de exploração de 5 minutos. No terceiro dia, 24 horas após o treino, foi realizado o teste de memória de longa duração, onde o objeto B foi trocado por outro objeto novo (objeto C). O Índice de Reconhecimento (IR) foi calculado baseado no tempo de exploração do novo objeto x100/ tempo exploração em ambos os objetos, gerando o Índice de Reconhecimento de Objeto ^{17,51,52}.

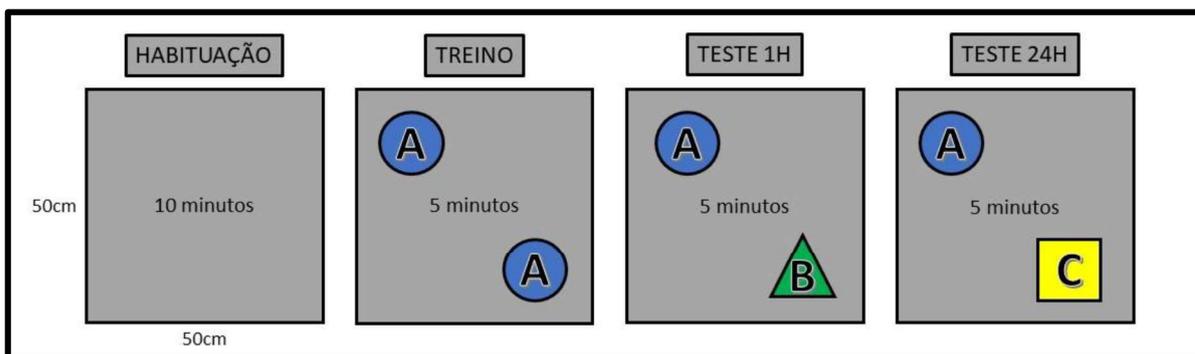


Figura 2 Tarefa de Reconhecimento de Objetos. Fonte: Própria autoria.

3.7 Anestesia, Eutanásia e Coleta de Amostras

Após os protocolos de tratamento, os animais foram anestesiados através de injeção IP de Cetamina (75 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg) a fim de promover o mínimo de dor e sofrimento do animal durante a manipulação de coleta biológica e eutanásia.

Posteriormente os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico e o fluido cerebrospinal (LCR) obtido por punção via cisterna magna utilizando seringa com agulha (27 G x ½ polegada). Em seguida os animais foram posicionados em decúbito dorsal e foi realizada uma incisão mediana ventral, a fim de expor a cavidade torácica para melhor visualização do músculo cardíaco, e, então realizada coleta de sangue por punção cardíaca. A amostra de sangue foi incubada a 37°C por 10 min e centrifugada a 1000 X g por 10 min ⁵³.

Os animais foram eutanasiados por decapitação, para minimizar o estresse, os procedimentos foram realizados por operador treinado em ambiente tranquilo na ausência de outros animais. Após, os encéfalos foram removidos e colocados em solução de tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4. Foi dissecado o hipocampo e fatiado através de equipamento de corte (McIlwain Tissue Chopper) para obtenção das amostras. Todas as amostras foram acondicionadas em freezer -80°C para posterior análise.

3.8 Captação de Glicose

A captação de glicose foi realizada segundo protocolo descrito por Pellerin e Magistretti ⁵⁴. As fatias recém coletadas foram incubadas a 35°C em solução equilibrada de Hanks (HBSS). Foram selecionadas 5 fatias de hipocampo de cada

animal, três para triplicata do ensaio e duas para duplicata do inespecífico. Para as amostras de inespecífico, o ensaio se iniciou com a adição de 25 μM de citocalasina-B, um inibidor do transportador de glicose do tipo 1 (GLUT-1). Após o tempo do inespecífico, para todas as amostras do ensaio de captação, foi iniciada a reação com a adição de 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $[2'3\text{-}^3\text{H}]$ deoxi-D-glicose. A incubação foi parada após 30 min com a remoção do meio e lavagem das células por três vezes com HBSS gelado. As células foram lisadas em uma solução 0,5 M de Hidróxido de Sódio (NaOH). Após a lise, foi adicionado o líquido de cintilação para reagir com a glicose remanescente no ensaio, a radioatividade foi medida em um contador de cintilação (Perkin Elmer Precisely Tri-Carb 2800TR). Os valores foram corrigidos pelo valor de proteínas totais de cada amostra utilizando o método de Lowry modificado por Peterson. Os resultados foram expressos em porcentagem do grupo controle ⁵⁵.

3.9 Western Blotting

Para a realização da técnica de Western Blotting, amostras de hipocampo foram previamente homogeneizadas em SDS Stopping Solution 4% (Stopping A) e fervidas a temperatura $\geq 90^\circ\text{C}$ por 5 minutos para desnaturação das proteínas.

Após o procedimento de homogeneização e desnaturação, as amostras foram centrifugadas a 10000 X g por 5 minutos e os sobrenadantes coletados para realização das etapas seguintes. Da alíquota foram utilizados 10 μL para duplicata de dosagem de proteínas totais, através do método de Lowry modificado por Peterson ⁵⁵. Ao volume restante da amostra foi adicionado Glicerol Sample Dilution Solution 40% (Stopping B), vortexados e centrifugados a 10000 X g por 5 minutos.

A partir da dosagem de proteínas totais, quantidades iguais de cada amostra (20 μg) foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O procedimento de transferência foi confirmado com coloração de Ponceau S.

As membranas foram bloqueadas com solução de 2% Ovo albumina em T-TBS *overnight* a 4°C . Após o bloqueio, foram incubados os anticorpos primários correspondentes, anti-aquaporina 4 (1:5000), anti-claudina-2 (1:5000), anti-claudina-5 (1:5000), anti-Kir 4.1 (1:5000) *overnight* a 4°C . Passado o período de incubação dos anticorpos primários, foram incubados os respectivos anticorpos secundários (IgG)

conjugados a peroxidase, anti-mouse (1:10000), anti-rabbit (1:10000), anti-goat (1:10000) por 2h a temperatura ambiente. Após a incubação dos anticorpos secundários, as membranas foram armazenadas em TBS para o procedimento de leitura. Entre cada uma das etapas de bloqueio e incubações foram realizadas lavagens com T-TBS.

O sinal de quimioluminescência foi detectado utilizando ECL Super Signal West Pico Plus (Thermo Fisher) em fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-Sciences). A densidade óptica das imagens obtidas no fotodocumentador foram calculadas com o software ImageJ (NIH) e os resultados apresentados por porcentagem do grupo controle.

3.10 Dosagem de Albumina no Líquor

O ensaio para quantificação de albumina foi realizado em amostras de LCR. O método foi validado de acordo com as diretrizes (FDA, 2018) ⁵⁶. Utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a detector de Fluorescência (HPLC-FLD) composto por sistema LC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-14A, termostato para coluna CTO-10A e detector de Fluorescência RF 20A. O software utilizado na aquisição e processamento dos dados foi o LC Solution. O FLD foi estabelecido em 278nm (excitação) e 335nm (emissão). Foi usada a coluna Agilent ZORBAX SB-C18 de fase reversa (tamanho de partícula de 5µm, 250×4,6mm d.i.). O método foi realizado usando condição de gradiente, consistindo de solvente A (H₂O + 0,1% de ácido fórmico) e solvente B (acetonitrila (ACN)) como segue: A → 65% B → 35% (0-5,0 min), A → 70% B → 30% (5,0–10 min), A → 65% B → 35% (10,0–17,0 min). A taxa de fluxo foi fixada em 0,7 mL / min. A orientação bioanalítica da FDA foi usada para realizar a validação do método. As soluções estoque de albumina foram preparadas em água a 1mg/mL e armazenadas a -20 ± 2 ° C. Para cada dia de análise, foram preparadas soluções padrão de albumina a 0,1, 0,5, 1, 10, 50 e 100 µg/mL. A preparação da amostra foi realizada adicionando 40µL de ACN em 10 µL de amostra de LCR e misturados em vórtice. Em seguida, a solução foi transferida para frascos cônicos e 10 µL foram injetados.

3.11 Dosagem de Albumina no Soro

A dosagem da quantidade de albumina presente nas amostras de soro foi realizada utilizando kit comercial Albumina Monoreagente (Bioclin K040). Em presença da Albumina, o Verde de Bromocresol forma um complexo corado, exibindo um espectro de absorção diferente do corante em estado livre, permitindo, assim, a dosagem da Albumina. A absorbância da coloração desenvolvida pela reação do kit foi calculada por espectrofotômetro Spectra Max I3 (Molecular Devices). Os resultados foram expressos em g/dL.

3.12 Análise estatística

Primeiro foi realizada análise estatística descritiva e a avaliação da normalidade dos dados. A partir dos resultados obtidos com o teste de normalidade foram utilizados testes comparativos para os tratamentos propostos. A análise paramétrica ou não paramétrica foi realizada a partir do teste de Shapiro Wilk. O valor de $p < 0,05$ foi utilizado como critério para significância estatística. Caso as suposições para os testes paramétricos fossem consideradas satisfeitas, utilizou-se teste estatístico de análise de variação, ANOVA de uma via, seguido de pós teste de Tukey.

PARTE III

5 DISCUSSÃO

Existem diferentes modelos experimentais de DA, sendo que um dos mais utilizados e difundidos na literatura é a infusão ICV de STZ, modelo que mimetiza a DA_e, que é o tipo de demência mais comum, correspondendo a mais de 95% dos casos de DA registrados no mundo ⁹. A DA desencadeia alterações fisiopatológicas, que se apresentam através de déficit cognitivo, prejuízo de memória, problemas de linguagem e prejuízo social. Neste estudo utilizamos o modelo de demência esporádica através de infusão ICV de STZ e uma semana após o estabelecimento do modelo iniciamos o tratamento com EX-4, uma droga antidiabética amplamente utilizada para DM do tipo I. Os animais foram tratados em dois protocolos distintos de tempo, 1 ou 3 semanas, com injeção diária IP de EX-4, sempre no início do período vespertino.

Observamos que em 2 semanas de indução do modelo, o grupo STZ apresentou baixo IR no teste comportamental de RO, demonstrando a eficácia do modelo ao induzir dano cognitivo; em contrapartida o grupo STZ+EX, que também foi submetido ao modelo de DA_e apresentou melhora nos parâmetros cognitivos, pois seus índices de IR foram semelhantes aos do grupo SHAM após 1 semana de tratamento com EX4 na memória de curto prazo, já em 3 semanas de tratamento observamos uma reversão parcial destes índices. Ao investigarmos a memória de longo prazo observamos o mesmo padrão no grupo STZ, onde o IR é baixo, os grupos STZ+EX apresentam reversão total nestes índices. Estes dados sugerem um efeito neuroprotetor da EX4 devido a melhora do parâmetro de memória nestes animais. Tal efeito já foi evidenciado em modelo de DM tipo I com STZ tratado com EX-4, evidenciando um papel do metabolismo da glicose no prejuízo de memória ¹⁶.

O hipometabolismo da glicose na DA é interpretado pela redução no consumo energético pelos neurônios, no entanto, não se pode ignorar possíveis alterações astrocitárias, visto que estas células utilizam glicose para síntese de importantes substratos do metabolismo neuronal, como a glutamina, glutathiona e colesterol. Em nosso trabalho comprovamos este déficit no metabolismo da glicose através da captação de glicose no hipocampo dos animais, demonstrando que em 2 semanas após a indução do modelo não há diferença estatística entre os grupos, havendo apenas uma tendência. Mas em 4 semanas após a indução do modelo fica

evidenciado o comprometimento do metabolismo glicolítico, devido à redução na captação de glicose nos animais submetidos ao modelo, surpreendentemente a EX4 reverteu totalmente estes parâmetros, demonstrando sua eficácia na neuroproteção na DA_e e sua ação na via glicolítica. Podemos ainda inferir que os danos relacionados ao metabolismo da glicose neste modelo experimental ocorrem de forma gradativa, conforme demonstrado por trabalhos anteriores ^{17,19,57}.

Na DM tipo II consequências diretas relacionadas a ação deficiente da insulina na periferia explicam anormalidades funcionais e estruturais ligadas a resistência à insulina, causando estresse metabólico e inflamação ⁵⁸. Pacientes com DA curiosamente apresentam mecanismos semelhantes entre a resistência à insulina periférica e o prejuízo na sinalização cerebral da insulina ⁵⁹. Os receptores de insulina (RI) são encontrados em diversas regiões do encéfalo, como no hipocampo, onde seus níveis são aumentados, indicando sua ação além do hipotálamo ⁶⁰. Quando os RI são ativados ocorre a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), que segundo a literatura estão diretamente envolvidos com os efeitos da insulina na memória e aprendizado. O IRS-1 encontra-se inibido no cérebro de pacientes com DA, bem como nos modelos animais, ao reduzir esta inibição, é obtida uma melhora na cognição em animais transgênicos para DA ⁶¹.

Nosso grupo observou em trabalhos anteriores que a proteína pIRS (Ser307) está aumentada em protocolo de 4 semanas após indução do modelo de DA_e, o sítio de fosforilação Ser307 indica resistência à insulina, observada na inflamação e desordens metabólicas, demonstrando que alterações no metabolismo da glicose estão diretamente envolvidas na progressão da DA ^{19,57,62}.

Apesar da grande relação entre DA e metabolismo da glicose, evidências sugerem que a patogênese da DA também possui uma forte interação com mecanismos imunológicos, proteínas mal dobradas e agregadas ligam-se a receptores na microglia e nos astrócitos, desencadeando uma resposta imune a partir da liberação de citocinas inflamatórias (TNF α , IL-6, IL-1 β), contribuindo para a progressão desta doença ⁶³.

A microglia é muito importante para a manutenção e plasticidade cerebral, contribuindo para a proteção e remodelação de sinapses. Essa ação é mediada pela liberação de fatores tróficos, incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que contribui para a formação da memória. Quando ativada por gatilhos

patológicos, como apoptose neuronal ou acúmulo de proteínas, a microglia migra para o local da lesão, iniciando uma resposta imune inata. Na DA, a microglia é capaz de se ligar ao β -amiloide por meio de receptores⁶³. No modelo de DA_e induzido por STZ, a ativação microglial fica evidenciada pelo aumento de IBA1, uma proteína ligante de cálcio exclusiva de microglia no SNC, que quando aumentada indica processo inflamatório²⁰.

As respostas patológicas astrocitárias incluem reatividade astrogliar, uma reação complexa de remodelação visando a neuroproteção e recuperação do tecido neural prejudicado. Assim como a microglia, os astrócitos liberam citocinas, interleucinas, óxido nítrico e outras moléculas potencialmente citotóxicas após a exposição ao β -amiloide, potencializando a resposta neuroinflamatória. A reatividade astrocitária é caracterizada por aumento na expressão da Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP), uma proteína estrutural, além da proteína S100B, uma proteína ligante de cálcio principalmente secretada pelos astrócitos, que atua de forma trófica ou tóxica de acordo com suas concentrações, e pode modular inclusive o metabolismo da glicose no SNC^{23,63-65}. Além disso, os astrócitos têm um papel importante na internalização e degradação de β -amiloide, regulando positivamente a expressão de proteases degradantes de β -amiloide extracelular, como neprilisina, IDE, ECE2 e ACE. Além dessas vias, os astrócitos têm um papel na depuração de A β solúvel do parênquima cerebral através de drenagem paravenosa, uma via dependente do canal de água AQP4^{35,37,66}.

Este conjunto de citocinas e fatores inflamatórios afeta diretamente a homeostase do SNC, atuando diretamente sobre a BHE. Citocinas se ligam em diferentes receptores, afetando desde a estrutura até as funções celulares. De acordo com nossos achados, o prejuízo a BHE possivelmente ocorra como um fator secundário no modelo de DA_e induzido por STZ, sendo consequência de fatores iniciais como neuroinflamação ou déficit do metabolismo da glicose, pois em 4 semanas ainda não se evidencia alterações em potencial na estrutura da BHE.

Com os dados de albumina líquórica e sérica avaliamos que a permeabilidade da BHE em 4 semanas não está aumentada. Proteínas relacionadas aos astrócitos, como AQP4 e Kir4.1, não se mostraram diminuídas, apesar de alterações astrocitárias evidenciadas pela diminuição da captação de glicose.

Ao analisar a estrutura das junções oclusivas, mostramos comprometimento da BHL a partir da Claudina-2, visto que em 4 semanas ocorre uma diminuição desta proteína, que é revertida parcialmente pela EX-4. Este prejuízo pode estar ligado a mudanças no sistema glinfático, visto que o SNC sofreu um insulto a partir da infusão de STZ. Como os níveis de Claudina-5 não foram afetados em 4 semanas, evidenciamos que esta alteração na estrutura das junções oclusivas foi específica da BHL e não da BHE.

Os resultados sugerem que a ação da EX-4 sobre os parâmetros de memória possivelmente ocorre devido a seu mecanismo de ação como agonista do GLP-1R, agindo através da via de sinalização da insulina, como mostrado na Figura 8. Estudos apontam também que o tratamento com EX-4 promove melhora em parâmetros mitocondriais de animais transgênicos 5xFAD e por infusão de β -amiloide ^{67,68}, melhora de dano cognitivo em modelo de amiloidose ⁶⁹⁻⁷¹, além de recuperar danos de BHE em modelo de DM tipo I ¹⁶. Outros agonistas do GLP-1R mostraram efeitos positivos reduzindo níveis de β -amiloide e citotoxicidade em modelo animal de DA ⁷², além de regular o crescimento celular através da expressão de IDE em modelo in vitro com β -amiloide ⁷³.

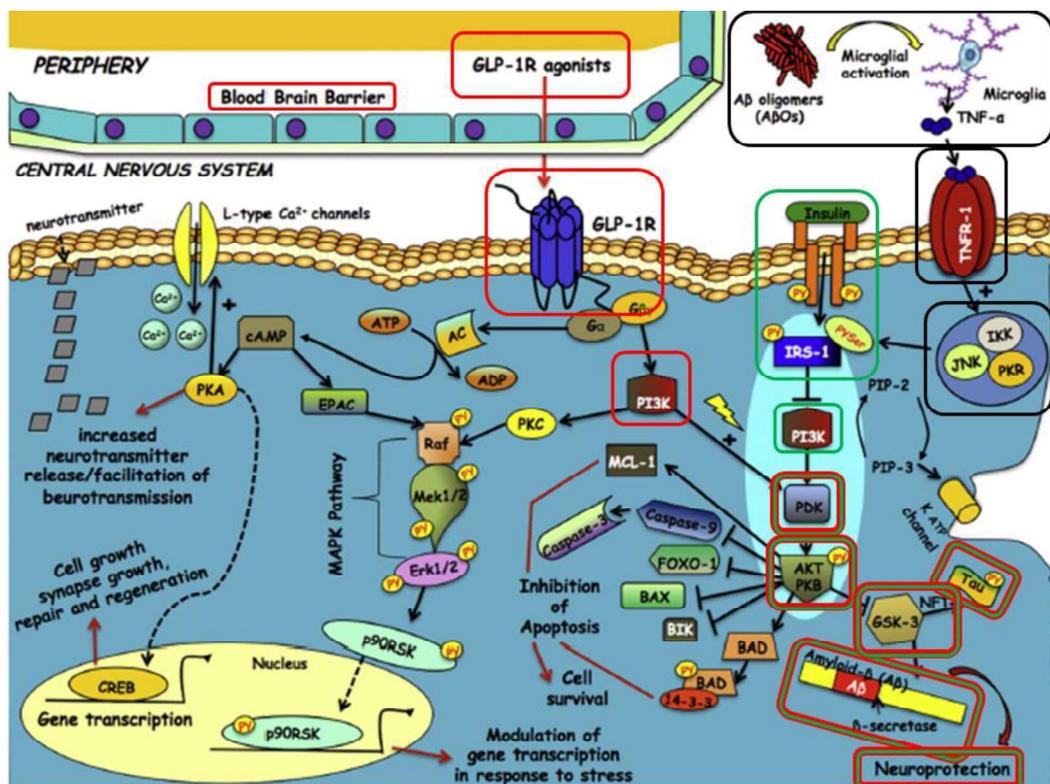


Figura 8. Mecanismo de ação dos Agonistas de GLP-1R. Adaptado de Palleria et al. 2016 ⁷⁴.

6 CONCLUSÃO

Foi demonstrado, a partir deste trabalho, que a relação entre DA e metabolismo da glicose é muito estreita, além da melhora significativa em diversos parâmetros bioquímicos a partir do uso de EX-4. Este estudo fortalece o potencial dos agonistas do GLP-1R como alternativa de terapia farmacêutica para DA, visto que são fármacos que já contam com aprovação para uso em DM. Entretanto, os parâmetros relacionados à BHE não sofreram grandes alterações, indicando que estes danos podem ser mais tardios no modelo estudado. Torna-se indispensável a realização de estudos mais aprofundados em relação aos mecanismos pelos quais a EX-4 causa melhoras no dano cognitivo, além de tempos de protocolo mais longos para melhor entender o modelo e a ação do STZ sobre a BHE e o metabolismo cerebral.

7 PERSPECTIVAS

Realizar técnica de imunohistoquímica e extravasamento de corante Azul de Evans para avaliar a BHE.

Analisar mais detalhadamente as diferenças de déficit cognitivo, bem como a reversão pela EX-4.

Verificar a ação da EX-4 sobre o metabolismo glutamatérgico no hipocampo.

Utilizar protocolos com maior tempo para avaliar parâmetros relacionados a deposição de β -amiloide.

Avaliar as alterações da Barreira Hematoliquórica para melhor entender o modelo.

Com o acréscimo de algumas análises gerar publicação a partir destes dados.

8 APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi apoiado e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shampo, M. A., Kyle, R. A. & Steensma, D. P. Alois Alzheimer—Alzheimer Disease. *Mayo Clin. Proc.* **88**, e155 (2013).
2. Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025. Geneva: World Health Organization. (2017).
3. Villemagne, V. L. *et al.* A β -amyloid and Tau Imaging in Dementia. *Semin. Nucl. Med.* **47**, 75–88 (2017).
4. Perl, D. P. Neuropathology of Alzheimer's Disease: D. P. PERL: NEUROPATHOLOGY OF ALZHEIMER'S DISEASE. *Mt. Sinai J. Med. J. Transl. Pers. Med.* **77**, 32–42 (2010).
5. Heinonen, O. *et al.* Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in alzheimer's disease. *Neuroscience* **64**, 375–384 (1995).
6. Scheff, S. W., Sparks, D. L. & Price, D. A. Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **34**, 356–361 (1993).
7. Sereniki, A. & Vital, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Rev. Psiquiatr. Rio Gd. Sul* **30**, (2008).
8. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **16**, 391–460 (2020).
9. Masters, C. L. *et al.* Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* **1**, 15056 (2015).
10. Reitz, C., Brayne, C. & Mayeux, R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 137–152 (2011).

11. Silva, M. V. F. *et al.* Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J. Biomed. Sci.* **26**, 33 (2019).
12. Erickson, M. A. & Banks, W. A. Blood–Brain Barrier Dysfunction as a Cause and Consequence of Alzheimer's Disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 1500–1513 (2013).
13. Chen, Z. & Zhong, C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog. Neurobiol.* **108**, 21–43 (2013).
14. Lorena Chaves, M., Luiza Camozzato, A., Godinho, C., Piazenski, I. & Kaye, J. Incidence of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease in Southern Brazil. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **22**, 181–187 (2009).
15. Baydas, G. *et al.* Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 797–804 (2003).
16. Zanotto, C. *et al.* Exendin-4 Reverses Biochemical and Functional Alterations in the Blood–Brain and Blood–CSF Barriers in Diabetic Rats. *Mol. Neurobiol.* **54**, 2154–2166 (2017).
17. Biasibetti, R. *et al.* Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. *Behav. Brain Res.* **316**, 205–214 (2017).
18. Rodrigues, L. *et al.* Hippocampal Alterations in Rats Submitted to Streptozotocin-Induced Dementia Model are Prevented by Aminoguanidine. *J. Alzheimers Dis.* **17**, 193–202 (2009).
19. dos Santos, J. P. A., Vizuete, A., Hansen, F., Biasibetti, R. & Gonçalves, C.-A. Early and Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **61**, 237–249 (2017).

20. dos Santos, J. P. A., Vizuete, A. F. & Gonçalves, C.-A. Calcineurin-Mediated Hippocampal Inflammatory Alterations in Streptozotocin-Induced Model of Dementia. *Mol. Neurobiol.* **57**, 502–512 (2020).
21. Engelhardt, B. & Sorokin, L. The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.* **31**, 497–511 (2009).
22. Coisne, C. & Engelhardt, B. Tight Junctions in Brain Barriers During Central Nervous System Inflammation. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1285–1303 (2011).
23. Gonçalves, C.-A., Concli Leite, M. & Nardin, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin. Biochem.* **41**, 755–763 (2008).
24. Abbott, N. J., Rönnbäck, L. & Hansson, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41–53 (2006).
25. Redzic, Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS* **8**, 3 (2011).
26. Marco, S. & Skaper, S. D. Amyloid β -peptide_{1–42} alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neurosci. Lett.* **401**, 219–224 (2006).
27. Wan, W., Chen, H. & Li, Y. The potential mechanisms of A β -receptor for advanced glycation end-products interaction disrupting tight junctions of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Int. J. Neurosci.* **124**, 75–81 (2014).
28. Chao, A.-C., Lee, T.-C., Juo, S.-H. H. & Yang, D.-I. Hyperglycemia Increases the Production of Amyloid Beta-Peptide Leading to Decreased Endothelial Tight Junction. *CNS Neurosci. Ther.* **22**, 291–297 (2016).

29. Sweeney, M. D., Sagare, A. P. & Zlokovic, B. V. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **14**, 133–150 (2018).
30. Rojas, H., Ritter, C. & Pizzol, F. D. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* **23**, 222–227 (2011).
31. Tsukita, S., Tanaka, H. & Tamura, A. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends Biochem. Sci.* **44**, 141–152 (2019).
32. Bednarczyk, J. & Lukasiuk, K. Tight junctions in neurological diseases. 16.
33. Zheng, G. *et al.* Beyond water channel: Aquaporin-4 in adult neurogenesis. *Neurochem. Int.* **56**, 651–654 (2010).
34. Liu, H., Zheng, Z. & Wintour, E. M. Aquaporins and Fetal Fluid Balance. *Placenta* **29**, 840–847 (2008).
35. Xu, M., Xiao, M., Li, S. & Yang, B. Aquaporins in Nervous System. in *Aquaporins* (ed. Yang, B.) vol. 969 81–103 (Springer Netherlands, 2017).
36. Barbara, B. Aquaporin Biology and Nervous System. *Curr. Neuropharmacol.* **8**, 97–104 (2010).
37. Francesca, B. & Rezzani, R. Aquaporin and Blood Brain Barrier. *Curr. Neuropharmacol.* **8**, 92–96 (2010).
38. Reeves, B. C. *et al.* Glymphatic System Impairment in Alzheimer’s Disease and Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. *Trends Mol. Med.* **26**, 285–295 (2020).
39. Ohno, Y., Hibino, H., Lossin, C., Inanobe, A. & Kurachi, Y. Inhibition of astroglial Kir4.1 channels by selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Res.* **1178**, 44–51 (2007).

40. Zanotto, C. *et al.* Non-specific inhibitors of aquaporin-4 stimulate S100B secretion in acute hippocampal slices of rats. *Brain Res.* **1491**, 14–22 (2013).
41. Kinboshi, M., Ikeda, A. & Ohno, Y. Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis. *Front. Neurol.* **11**, 626658 (2020).
42. Szablewski, L. Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **55**, 1307–1320 (2016).
43. Drucker, D. J. & Nauck, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet* **368**, 1696–1705 (2006).
44. Trujillo, J. M., Nuffer, W. & Ellis, S. L. GLP-1 receptor agonists: a review of head-to-head clinical studies. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **6**, 19–28 (2015).
45. Mentlein, R., Gallwitz, B. & Schmidt, W. E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* **214**, 829–835 (1993).
46. Green, B., Gault, V., O'Harte, F. & Flatt, P. Structurally Modified Analogues of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) and Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) As Future Antidiabetic Agents. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 3651–3662 (2004).
47. Kastin, A. J. & Akerstrom, V. Entry of exendin-4 into brain is rapid but may be limited at high doses. *Int. J. Obes.* **27**, 313–318 (2003).
48. Tai, J., Liu, W., Li, Y., Li, L. & Hölscher, C. Neuroprotective effects of a triple GLP-1/GIP/glucagon receptor agonist in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1678**, 64–74 (2018).

49. Calsolaro, V. & Edison, P. Novel GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) Analogues and Insulin in the Treatment for Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *CNS Drugs* **29**, 1023–1039 (2015).
50. Hamilton, A., Patterson, S., Porter, D., Gault, V. A. & Holscher, C. Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain. *J. Neurosci. Res.* **89**, 481–489 (2011).
51. Borsoi, M. *et al.* Immobility behavior during the forced swim test correlates with BDNF levels in the frontal cortex, but not with cognitive impairments. *Physiol. Behav.* **140**, 79–88 (2015).
52. Klein, C. P. *et al.* Physical Exercise During Pregnancy Prevents Cognitive Impairment Induced by Amyloid- β in Adult Offspring Rats. *Mol. Neurobiol.* **56**, 2022–2038 (2019).
53. Vicente, É. *et al.* S100B LEVELS IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF RATS ARE SEX AND ANAESTHETIC DEPENDENT. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **0**, 070717222933003-??? (2007).
54. Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 10625–10629 (1994).
55. Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346–356 (1977).
56. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. 44 (2018).
57. Rodrigues, L. *et al.* Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins linked to glucose metabolism alterations. *Neurochem. Int.* **128**, 85–93 (2019).

58. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–445 (2011).
59. De Felice, F. G., Lourenco, M. V. & Ferreira, S. T. How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease? *Alzheimers Dement.* **10**, S26–S32 (2014).
60. De Felice, F. G. Connecting Type 2 diabetes to Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* **13**, 1297–1299 (2013).
61. Lourenco, M. V. *et al.* TNF- α Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's β -Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys. *Cell Metab.* **18**, 831–843 (2013).
62. Gonçalves, C.-A. *et al.* Glycolysis-Derived Compounds From Astrocytes That Modulate Synaptic Communication. *Front. Neurosci.* **12**, 1035 (2019).
63. Heneka, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **14**, 388–405 (2015).
64. Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H. M. & Arolt, V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* **60**, 614–632 (2003).
65. Wartchow, K. M. *et al.* Insulin Stimulates S100B Secretion and These Proteins Antagonistically Modulate Brain Glucose Metabolism. *Neurochem. Res.* **41**, 1420–1429 (2016).
66. Benfenati, V. & Ferroni, S. Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* **168**, 926–940 (2010).
67. An, J. *et al.* Exenatide alleviates mitochondrial dysfunction and cognitive impairment in the 5 \times FAD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* **370**, 111932 (2019).

68. Garabadu, D. & Verma, J. Exendin-4 attenuates brain mitochondrial toxicity through PI3K/Akt-dependent pathway in amyloid beta (1–42)-induced cognitive deficit rats. *Neurochem. Int.* **128**, 39–49 (2019).
69. Jia, X.-T. *et al.* Exendin-4, a glucagon-like peptide 1 receptor agonist, protects against amyloid- β peptide-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Physiol. Behav.* **159**, 72–79 (2016).
70. Wang, X. *et al.* Exendin-4 antagonizes A β 1-42-induced attenuation of spatial learning and memory ability. *Exp. Ther. Med.* **12**, 2885–2892 (2016).
71. Gault, V. A. & Hölscher, C. GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid. *Eur. J. Pharmacol.* **587**, 112–117 (2008).
72. Li, Y. *et al.* GLP-1 Receptor Stimulation Reduces Amyloid- β Peptide Accumulation and Cytotoxicity in Cellular and Animal Models of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **19**, 1205–1219 (2010).
73. Li, H. *et al.* GLP-1 receptor regulates cell growth through regulating IDE expression level in A β 1–42-treated PC12 cells. *Biosci. Rep.* **38**, BSR20171284 (2018).
74. Palleria, C. *et al.* Potential effects of current drug therapies on cognitive impairment in patients with type 2 diabetes. *Front. Neuroendocrinol.* **42**, 76–92 (2016).