

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

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROGLIAIS EM MODELO  
DE DEMÊNCIA INDUZIDO POR INFUSÃO  
INTRACEREBROVENTRICULAR DE ÁCIDO OCADÁICO

NÚBIA BROETTO CUNHA

Porto Alegre  
2016

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

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROGLIAIS EM MODELO  
DE DEMÊNCIA INDUZIDO POR INFUSÃO  
INTRACEREBROVENTRICULAR DE ÁCIDO OCADÁICO

NÚBIA BROETTO CUNHA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em neurociências.

Porto Alegre

2016

*“A minha mãe, Rosa Broetto, com todo amor.”*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador CA, pelos ensinamentos, confiança e orientações, principalmente nessa reta final, foi essencial pra mim. Agradeço muito por ter apoiado e compreendido a minha decisão em aproveitar a oportunidade docente que tive. Foi ótimo ter convivido com um orientador otimista, bem humorado e amigo.

A todos os meus colegas do Lab 33, agradeço a convivência e aprendizado que me propiciaram. Em especial, aqueles que me auxiliaram no lab e na vida: Jô, sempre pronta para ouvir e dar apoio do doutorado à vida. Obrigada pelas oportunidades que me propiciou e por ser essa grande torcedora do meu sucesso e felicidade. Fran, minha IC, sempre muito prestativa e organizada, me auxiliou neste trabalho (e na vida) muito mais do que imagina. Fer Hansen, Efigênia, sempre muito eficiente, prestativa e pronta para auxiliar, obrigada pela ajuda e pelas trocas de ideias científicas (e não científicas). Cris, “Criseldinha”, sempre super disposta, calma e bem humorada (mesmo quando dizia estar de mau humor), experimentos e lazer contigo são diversão garantida. Dani, Pati, Márcio, Fafá, Paulinha, Prof. Marina que também muito me auxiliaram, obrigada pela disposição e carinho.

As minhas grandes amigas: Beta, obrigada por ser essa grande amiga que eu sei que posso sempre contar e por estar sempre presente; Dalila, minha amiga de infância, um grande reencontro; Sica e Gi – obrigada pelas sessões de terapia e profundidades da vida, risadas e todo carinho e torcida. E claro, as que me aguentaram por alguns anos na Santo Antônio: Lígia, Marcela, Camila e demais, obrigada pela parceria. As minhas colegas de Ulbra, pelo apoio e parceria nesses últimos dois anos.

Ao Jean, obrigada pelo carinho, compreensão, paciência e apoio nessa reta final, que bom que estavas comigo, mesmo longe.

A minha família: vó, mãe, pai, Chico, irmãos Bella e Jonathan e toda “Broettada”, obrigada pelo amor, apoio, admiração e por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas e felicidade.

Aos funcionários do biotério e a Patrícia Sesterheim pela dedicação e comprometimento com os animais utilizados neste estudo.

Aos professores, colegas e funcionários do PPG Neurociências, obrigada pela convivência e aprendizado.

Agradeço as agências de fomento CNPq e CAPES, que viabilizaram a realização desse trabalho.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

## SUMÁRIO

PARTE I.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
1. Demência.....	5
2. Modelo animal de demência por infusão de ácido ocadáico.....	10
3. Astrócitos, função no SNC e alterações em doenças neurodegenerativas.....	12
OBJETIVOS.....	19
PARTE II.....	20
CAPÍTULO 1.....	21
CAPÍTULO 2.....	30
PARTE III.....	38
DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÕES.....	52
PERSPECTIVAS.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## PARTE I



## LISTA DE ABREVIATURAS

AO	ácido ocaadáico
ATP	trifosfato de adenosina
BDNF	fator neurotrófico derivado do encéfalo
DA	doença de Alzheimer
GABA	ácido gama-amino butírico
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GLUT-1	transportadores de glicose tipo 1
GLUT-3	transportadores de glicose tipo 3
GS	glutamina sintetase
GSH	glutationa reduzida
GSSG	glutationa oxidada
ICV	intracerebroventricular
LCE	líquido cerebrospinal
LDH	atividade da lactato desidrogenase
MAP	proteína associada ao microtúbulo
MTT	ensaio do metil tiazol tetrazólio
NMDA	N-metil D-Aspartato
NR1	subunidade 1 do receptor NMDA
NR2	subunidade 2 do receptor NMDA
SNC	sistema nervoso central
STZ	estreptozotocina

## RESUMO

Emaranhados neurofibrilares intraneuronais, juntamente com as placas beta-amilóide e astrogliose são importantes marcadores neuropatológicos da doença de Alzheimer (DA). Apesar dos mecanismos envolvidos na DA do tipo esporádica ainda não estarem bem esclarecidos, a hiperfosforilação da proteína tau é sugerida como grande fator para o desenvolvimento dos emaranhados neurofibrilares, que podem gerar disfunção neuronal e morte. A toxina ácido ocadáico (AO) é considerada um efetivo inibidor das fosfatases 1 e 2A, as quais podem gerar a hiperfosforilação da tau. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo, avaliar alterações neurogliciais em hipocampo e líquido cerebrospinal (LCE) de ratos expostos ao AO intracerebroventricular após 3 e 12 semanas da infusão. E ainda, verificar alterações neurogliciais de fatias hipocampais expostas de forma aguda ao AO (*in vitro*). Como resultados encontramos no modelo *in vivo*, declínio cognitivo, hiperfosforilação da tau (Ser 396) e alteração astroglicial hipocampal principalmente devido a redução da captação de glicose e aumento da expressão da GFAP e ainda, redução da S100B no LCE, a qual pode atuar na sinalização neurônio-astrocítico, em condições fisiológicas ou patológicas, como na DA. Ao observar as alterações neurogliciais 12 semanas após a infusão, verificamos que o modelo é parcialmente reversível, uma vez que a fosforilação da proteína tau não mostrou alteração, mas foi observado declínio cognitivo em um dos comportamentos realizados e hipometabolismo da glicose. E ainda, *in vitro*, o AO foi capaz de hiperfosforilar a proteína tau (Ser 396), mas não alterou parâmetros astrogliciais. Portanto, o modelo animal se mostra adequado para avaliação de alterações neuroquímicas. Mas nossos resultados também apontam para uma reversibilidade parcial do modelo a longo prazo, indicando a necessidade de cautela na avaliação de estratégias terapêuticas com este modelo. E ainda, nossos dados reforçam a importância de investigar alterações do metabolismo cerebral da glicose em indivíduos com déficit cognitivo.

## ABSTRACT

Intraneuronal aggregates of neurofibrillary tangles (NFTs), together with beta-amyloid plaques and astrogliosis, are important markers of Alzheimer's disease (AD). The underlying mechanism of sporadic AD remains poorly understood, but abnormal hyperphosphorylation of tau protein is suggested to have a role in NFTs genesis, which leads to neuronal dysfunction and death. The okadaic acid (OKA) toxin is a protein phosphatase 1 e 2A inhibitor and can lead to tau protein hyperphosphorylation. We have investigated the effects of intracerebroventricular (ICV) OKA on neuroglial alterations 3 and 12 weeks after OKA infusion. We have also researched the effects on neuroglial parameters on hippocampal slices treated with OKA *in vivo*. Our results have shown cognitive impairment, hippocampal astrogliosis, based on GFAP increment, decreased glucose uptake and increase on tau phosphorylation (at Ser396) in hippocampus and decrease in S100B protein on cerebrospinal fluid 3 weeks after ICV OKA-infusion. Moreover, 12 weeks after ICV OKA infusion we also observed a cognitive impairment and decreased on glucose uptake. *In vitro*, exposure of hippocampal slices to OKA altered tau phosphorylation at Ser396 without any associated change in astroglial function. In conclusion, the OKA-animal model proved to be a suitable model for neurochemical parameters assessment. Our results also indicate a partial reversibility of long-term animal model, suggesting that therapeutics strategies evaluations must be caution on this model; and reinforce how important is to investigate on brain glucose metabolism alterations on cognitive impairment.

# INTRODUÇÃO

## 1. Demência

A expectativa de vida da população mundial vem apresentando grande aumento. Isso se deve a melhoria de infraestrutura, saneamento básico, maior acesso e atenção à alimentação, atividade física e também ao avanço na compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no processo de envelhecimento. Contudo, esse crescimento na longevidade populacional mundial trouxe também um grande aumento no índice de diferentes morbidades nessa população (FREEMANTLE et al., 2006; GRADY, 2013).

Desse modo, o crescimento demográfico da faixa etária de idosos está diretamente associado a um maior risco de desenvolvimento de demências, em sua maioria causada pela Doença de Alzheimer (DA) (PRINCE et al., 2013).

A demência é considerada uma disfunção crônica e progressiva da atividade cortical e/ou subcortical que resulta em um complexo declínio cognitivo (RITCHIE; LOVESTONE, 2002). Usualmente é de natureza progressiva, ou seja, o prejuízo sobre aspectos cognitivos básicos, como memória, orientação espacial, compreensão de linguagem ou de associações fatuais, capacidade de aprendizado, prejuízo na linguagem e no julgamento, é muito maior que o esperado em função do aumento da idade. Além disso, o prejuízo da função cognitiva é comumente acompanhado, e ocasionalmente precedido, por deterioração do controle emocional, social, comportamento ou motivação (JALBERT et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

O crescente número de casos com demência é uma preocupação global, pois afeta ambos, países desenvolvidos e em desenvolvimento. E essa é uma questão que deve ser tratada como um problema de saúde pública, pois causa prejuízos não somente à saúde do paciente, mas também afeta diretamente a vida dos familiares e daqueles que

convivem com o paciente. Economicamente, é uma questão de suma importância, pois impõem um maior uso de serviços de saúde (público e privado) e levanta o debate sobre a previdência social (JALBERT et al., 2008; PRINCE et al., 2013).

As estimativas quanto à prevalência são de 44 milhões de indivíduos afetados no mundo e a incidência de 7.7 milhões de novos casos anualmente. O perfil epidemiológico da demência tem aumentado progressivamente, o qual pode chegar a duplicar em número de casos no ano de 2030 e triplicar em 2050, evidenciando o problema econômico, social e de saúde pública, especialmente em países de baixa renda (CHATTERJEE et al., 2015).

Existem diversos tipos de demência, com distintas manifestações clínicas e patológicas, como a demência vascular, demência dos corpos de Lewy, demência frontotemporal, demências seguidas de lesões ou traumas físicos, entre outras (CASTELLANI et al., 2009). Porém, o tipo predominante é a doença de Alzheimer, a qual corresponde cerca de 70% dos casos de demência (CHATTERJEE et al., 2015).

### **1.1 Doença de Alzheimer**

A DA é uma desordem neurodegenerativa progressiva. Os sintomas iniciais incluem dificuldade em lembrar nomes e eventos recentes, apatia, e depressão. Sintomas tardios incluem perda da memória, prejuízo no julgamento, desorientação, confusão, mudanças do comportamento, afasia, disfagia e apraxia (RASKIN et al., 2015). A DA cursa com uma degeneração neuronal progressiva, causando uma redução da substância cinzenta cerebral e disfunção cognitiva que eventualmente levam à morte (HANNAN et al., 2016).

A doença pode ser classificada em dois tipos: (i) *Tipo I* ou hereditária, associada a uma mutação de diferentes genes, como o da presenilina, proteína precursora amilóide

ou apolipoproteína E; (ii) *Tipo II* ou esporádica, onde todos os indivíduos estão suscetíveis à medida que envelhecem. Acredita-se que esta última esteja relacionada ao estilo de vida e fatores de risco, como distúrbios metabólicos, obesidade, hipercolesterolemia e diabetes *mellitus* (HALLSCHMID; SCHULTES, 2009; HOYER, 2002).

Na doença de Alzheimer existem dois principais achados neuropatológicos: as placas senis ou amilóides, formadas pelo depósito extracelular do peptídeo beta-amilóide, e os emaranhados neurofibrilares intracelulares resultantes da deposição anormal da proteína tau, uma proteína associada aos microtúbulos, a qual apresenta-se hiperfosforilada ou poliubiquitinada, neste caso patológico (CASTELLANI et al., 2009; JALBERT et al., 2008).

Em associação aos achados neuropatológicos característicos da DA, observa-se uma série de eventos que podem levar a uma disfunção cerebral progressiva (HANNAN et al., 2016). Esses eventos são encontrados principalmente em neurônios colinérgicos do córtex pré-frontal e hipocampo, juntamente com suas áreas relacionadas, regiões cerebrais que são responsáveis pela cognição e formação de memórias. Assim, cria-se um quadro de desequilíbrio neuroquímico, onde aparecem sinais de neuroinflamação, neurodegeneração, estresse oxidativo, aumento da sinalização pró-apoptótica, déficit colinérgico, excitotoxicidade glutamatérgica, disfunção mitocondrial e da homeostase do cálcio, com prejuízo da transmissão sináptica e do equilíbrio de diferentes neurotransmissores (EIKELENBOOM et al., 2006; SELKOE, 2001).

### **1.1.1 Proteína tau e Emaranhados Neurofibrilares**

A tau é uma das principais proteínas associadas ao microtúbulo (MAP) nos neurônios, que interage com a tubulina promovendo a estabilização dos microtúbulos (Figura 1).

A tau age auxiliando na promoção do crescimento de neuritos, nas interações de membrana, na facilitação do ancoramento de enzimas, e no transporte axonal de organelas ao terminal axonal. É uma fosfoproteína e sua atividade biológica é regulada pelo grau de sua fosforilação (IQBAL et al., 2005). É encontrada predominantemente em neurônios apesar de estar presente em todas as células nucleadas (CASTELLANI et al., 2009).

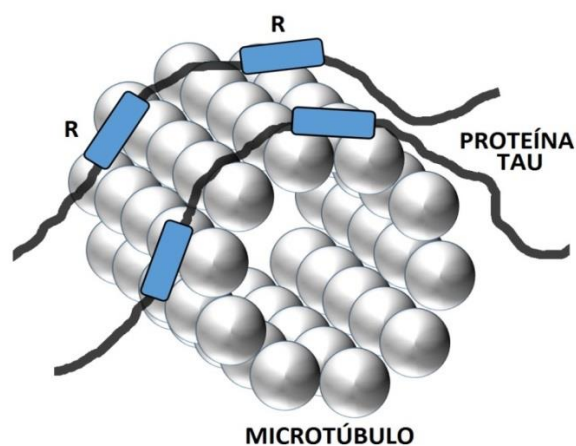


Figura 1. Proteína tau promovendo a estabilização do microtúbulo.

Os níveis de fosforilação das células resultam em um delicado equilíbrio entre proteínas fosfatases e proteínas cinases (Figura 2). As cinases transferem o fosfato da ATP para a proteína, enquanto as fosfatases removem o grupo fosfato, desfosforilando a proteína. A regulação dos níveis de proteínas fosforiladas é fundamental para um grande número de processos celulares, tais como síntese proteica, transporte intracelular, expressão gênica, contração muscular e metabolismo do glicogênio (LOUZÃO et al., 2005).

As proteínas cinases e fosfatases são responsáveis por manter os níveis fisiológicos da proteína tau fosforilada e não-fosforilada (desfosforilada) estáveis (RASKIN et al., 2015). Patologicamente, a tau se apresenta hiperfosforilada diretamente

nos sítios serina/treonina incluindo a Ser-202/ Thr-205, Ser-214 e/ou Ser-212, Thr- 231 e/ou Ser-235, e Ser-396 / Ser-404 (CASTELLANI et al., 2009). Essa hiperfosforilação da tau anula sua afinidade com os microtúbulos e ainda promove uma afinidade com a tau que se encontra em níveis normais de fosforilação, com a proteína associada ao microtúbulo (MAP) 1 e com a MAP 2. O sequestro dessas três proteínas causa inibição e desmontagem dos microtúbulos. Na DA, os níveis de proteína tau encontram-se de 4 a 8 vezes maiores do que os níveis de encéfalos controle (RASKIN et al., 2015).

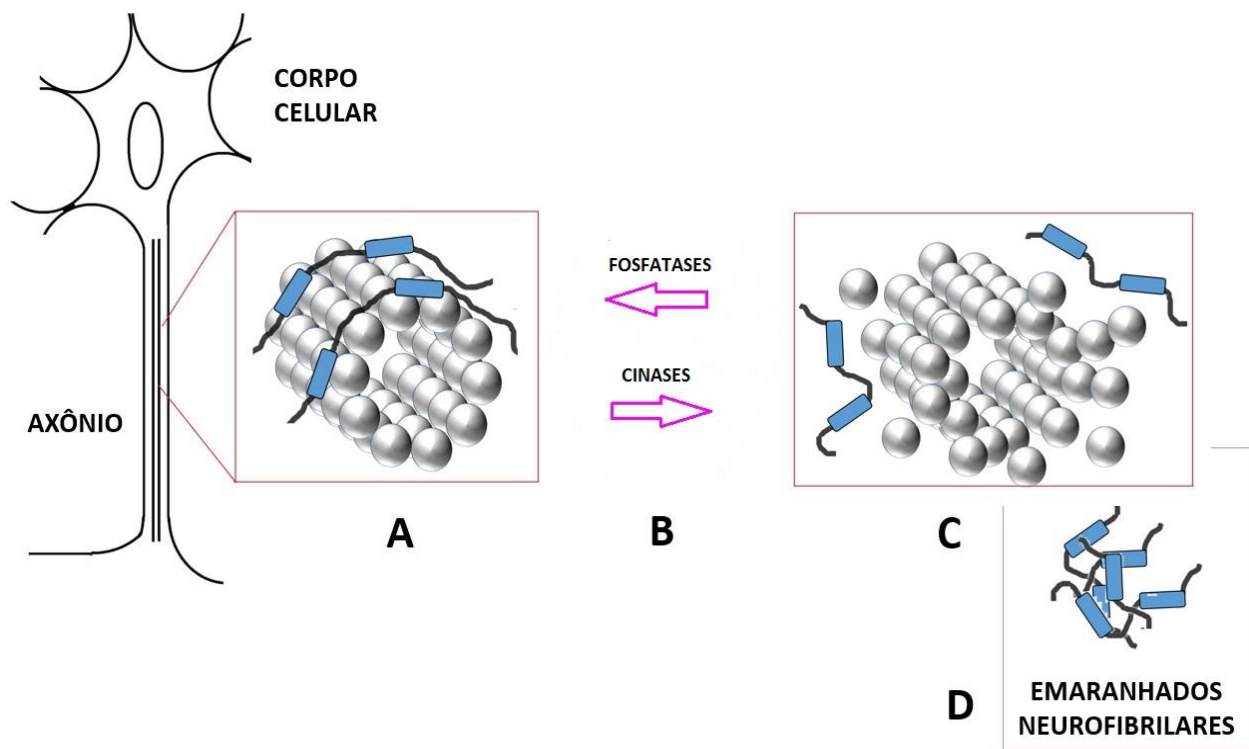


Figura 2: Representação de proteínas cinases e fosfatases, microtúbulos e tau na doença de Alzheimer. (A) Proteína tau promovendo a estabilização dos microtúbulos; (B) cinases e fosfatases mantem o nível de fosforilação e desfosforilação normais da proteína tau; (C) na doença de Alzheimer ocorre um desequilíbrio, gerando a hiperfosforilação da proteína tau e com isso, a tau se desprende dos microtúbulos; (D) e torna-se filamentos helicais pareados, os quais se agregam e formam os emaranhados neurofibrilares.

Desse modo, o aumento excessivo da fosforilação da tau que acompanha a DA, particularmente em determinados sítios fibrilogênicos (por exemplo, na serina 396)



pode resultar na desagregação microtubular e formação de emaranhados (TROJANOWSKI; LEE, 2013; STOOHOFF; JOHNSON, 2005). Essa separação da tau a partir dos microtúbulos é possivelmente também desencadeada por outros fatores como pela beta-amilóide, estresse oxidativo e mediadores inflamatórios, que por mobilização de  $Ca^{2+}$  e proteínas cinases levam a formação dos emaranhados neurofibrilares. Portanto, com a perda da função da tau normal, da estabilização e manutenção dos microtúbulos, combinada a toxicidade que ela adquire, pode comprometer o transporte axonal e contribuir para a degeneração sináptica, gerando uma disfunção celular (CASTELLANI et al., 2009).

## **2. Modelo animal de demência por infusão de ácido ocadáico**

Na busca de mimetizar os achados neuropatológicos e/ou comportamentais encontrados na DA, alguns modelos animais têm sido utilizados com o intuito de propiciar o estudo e o entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da demência associada a DA. Os modelos animais, mesmo com suas limitações, auxiliam na compreensão de muitos detalhes do processo da doença. E também na investigação de terapias experimentais antes da sua aplicação em pesquisa com humanos.

Os modelos animais transgênicos buscam mimetizar a doença de Alzheimer do tipo I (familiar), enquanto os não transgênicos são utilizados para mimetizar a do tipo II (esporádica), a qual corresponde a cerca de 95% dos pacientes com DA (GRIEB, 2016). Diversas drogas têm sido testadas para produzir modelos animais não transgênicos. Porém, esses modelos são restritivos e reproduzem apenas algumas características encontradas em pacientes e não uma evolução completa de todos os elementos neuropatológicos da doença. Dentre os modelos não transgênicos atualmente estudados pode-se citar: a infusão intracerebroventricular (ICV) do peptídeo beta-amilóide

(CRAFT et al., 2005), da toxina botulínica (LACKOVIĆ et al., 2009), lesão do núcleo basal magnocelular (WEINSTOCK; SHOHAM, 2004), infusão ICV de estreptozotocina (HOYER, 2002; RODRIGUES et al., 2011) e infusão do ácido ocadáico ICV (KAMAT et al., 2010; 2012) e intrahipocampal (COSTA et al., 2012).

A infusão de ácido ocadáico tem-se mostrado um modelo animal de demência capaz de gerar hiperfosforilação da proteína tau (SUN et al., 2003), morte neuronal (KAMAT et al., 2014a), déficit no sistema antioxidante (COSTA et al., 2012; KAMAT et al., 2010; 2012), neuroinflamação (KAMAT et al., 2012) e déficit na memória de reconhecimento espacial (COSTA et al., 2012; KAMAT et al., 2010). Desta forma, mostra-se como um modelo animal capaz de produzir achados presentes em pacientes com doença de Alzheimer, possibilitando o estudo fisiopatológico dos mesmos.

O ácido ocadáico (AO) é uma toxina e foi isolado pela primeira vez da esponja marinha *Halichondria Okadaii*. É considerado uma das principais toxinas marinhas associadas a distúrbios gastrointestinais em humanos (LOUZÃO et al., 2005). O AO é um inibidor seletivo das proteínas fosfatases 1 e 2A nos resíduos serina/treonina com predominância de inibição sobre a proteína fosfatase 2A (ARIAS et al., 1998). Essa inibição é capaz de mediar a fosforilação da proteína tau e induzir morte neuronal, tanto *in vitro* (CAGNOLI et al., 1996) quanto *in vivo* (HE et al., 2001). Em cultura de neurônios corticais de ratos, mostrou-se que o ácido ocadáico induziu morte celular pelo aumento da fosforilação da MAP-2 e da proteína tau concomitantemente com mudanças iniciais que ocorrem no citoesqueleto neuronal (ARIAS et al., 1998). O modelo animal *in vivo*, é produzido por infusão de AO tanto intrahipocampal quanto ICV, em roedores. Nesses modelos tanto intrahipocampal quanto ICV, os parâmetros comportamentais, neuroquímicos e histológicos estudados até o momento, foram observados em média de 2 a 3 semanas pós infusão de ácido ocadáico (COSTA et al., 2012; KAMAT et al.,

2010; 2012). Não há informação sobre qual a melhor dose administrar por injeção ICV ou se as alterações descritas são mantidas por longo prazo.

### **3. Astrócitos, função no SNC e alterações em doenças neurodegenerativas**

Os astrócitos são as células gliais mais abundante do SNC (PEKNEY et al., 2016). Nas últimas duas décadas este tipo celular recebeu um novo lugar na hierarquia da fisiologia do encéfalo. A descoberta da comunicação bidirecional entre astrócitos e neurônios mostrou o papel ativo dos astrócitos na sinalização e modulação da comunicação sináptica (OSBORN et al., 2015).

Atualmente sabe-se que essas células estão envolvidas em diversas funções, como o controle da homeostase molecular, regulação da concentração de íons e neurotransmissores (DANBOLT, 2001); manutenção da homeostase metabólica; formação e manutenção da barreira hematoencefálica e controle do fluxo sanguíneo (MOLOFSKY et al., 2012). Possuem importante papel na transmissão e plasticidade sináptica, uma vez que fazem parte da sinapse tripartite (PEREA et al., 2009), sendo responsáveis pelo tamponamento de potássio, captação e conversão do glutamato em glutamina, defesa antioxidante, envolvidos na homeostase do cálcio e até a própria modulação sináptica (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994).

Desta forma, em condições fisiológicas desempenham funções cruciais, uma vez que sua morfologia altamente ramificada e o contato íntimo com os neurônios tornam-nos altamente propício para a manutenção de um ambiente equilibrado e favorável para a função neuronal adequada (OSBORN et al., 2015).

Na maioria das doenças neurodegenerativas e lesões cerebrais são encontradas desordens nos astrócitos, os quais podem sofrer alterações morfológicas e funcionais, denominadas de astrogliose; acredita-se que a disfunção sináptica e perda neuronal que

ocorrem na DA, estejam associadas a este evento. A astrogliose é mais frequentemente evidenciada pela expressão aumentada da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (ENG et al., 2000) e está associada com o aumento da produção de fatores, os quais podem ser benéficos ou prejudiciais para as células vizinhas (PEKNY et al., 2016); além disso, liberam antioxidantes, como a glutatona, que protege os neurônios do estresse oxidativo, e remove o excesso de glutamato, prevenindo desta maneira, a toxicidade glutamatérgica (LEWERENZ; MAHER, 2015).

### **3.1 Proteína Glial Fibrilar Ácida**

A proteína ácida fibrilar glial, GFAP (do inglês *Glial fibrilar acidic protein*), é expressa exclusivamente em astrócitos no SNC (BABA et al., 1997). É a principal proteína dos filamentos intermediários, constituindo o citoesqueleto dos astrócitos maduros (GOMES et al., 1999). Após processo de injúria ao SNC, os astrócitos se tornam mais reativos e respondem com aumento rápido da síntese de GFAP, processo este chamado de astrogliose (BABA et al., 1997; ENG et al., 2000), como observado em modelos animais de demência (COSTA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2011).

### **3.2 S100B**

Assim como a GFAP apresenta-se expressa em astrócitos, a proteína S100B também é considerada um marcador deste tipo celular. Os astrócitos são responsáveis pela maior parte da expressão desta proteína, além de serem capazes de promover a secreção da mesma de maneira regulada (GONÇALVES et al., 2008). A S100B pertence à família das proteínas ligantes de cálcio onde, no encéfalo, é responsável por diversas funções intra e extracelulares (DONATO et al., 2013; 2009). Algumas das funções intracelulares realizadas por essa proteína são: inibição da fosforilação proteica,

regulação da atividade enzimática, modulação do citoesqueleto e regulação do crescimento e diferenciação celular (DONATO et al., 2013).

O conteúdo extracelular da S100B tem sido proposto como um marcador de ativação astrogliar no SNC, e desta forma, a doença de Alzheimer tem sido a doença neurodegenerativa mais frequentemente estudada (GONÇALVES et al., 2008). Pesquisas realizadas pelo laboratório de proteínas ligantes de cálcio da UFRGS observou uma redução dos níveis da S100B no líquido cerebrospinal (LCE) em diversos modelos animais de demência (BIASIBETTI et al., 2013; COSTA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2011).

### **3.3 Glutamina sintetase e neurotransmissão**

O tecido cerebral possui uma notável habilidade de acumular glutamato, sendo este o principal neurotransmissor mediador de sinais excitatórios no SNC de mamíferos (DANBOLT, 2001). Os astrócitos são essenciais para a transmissão glutamatérgica e gabaérgica por serem elementos chave na síntese do glutamato a partir da glutamina e no ciclo glutamina-glutamato (Figura 3). Além disso, os astrócitos são fundamentais para a plasticidade sináptica associada a processos cognitivos (OSBORN et al., 2015). E do mesmo modo, o glutamato está envolvido em muitos aspectos das funções normais cerebrais; incluindo cognição, memória e aprendizado. Ele funciona diretamente como neurotransmissor (sistema glutamatérgico) e precursor do ácido gama-amino butírico (GABA) (sistema gabaérgico) (DANBOLT, 2001).

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima presente em diversos órgãos ou tecidos como fígado, rins, coração, músculo esquelético, baço e encéfalo, a mesma utiliza ATP para converter glutamato e amônia em glutamina (WALTON; DODD, 2007). No cérebro a GS é predominantemente expressa em astrócitos e desempenha

papel crucial na detoxificação da amônia do cérebro e na regulação dos níveis de glutamato (SUAREZ et al., 2002). Deste modo, o glutamato é convertido em glutamina pela GS no astrócito, para que subsequentemente a glutamina seja transportada para o neurônio e convertida em glutamato (DANBOLT, 2001).

O transporte de glutamato-glutamina torna ambos, os astrócitos e a GS, essenciais para a neurotransmissão glutamatérgica (WALTON; DODD, 2007). Ao mesmo tempo, a captação de glutamato pelos astrócitos previne a excitotoxicidade glutamatérgica (DANBOLT, 2001); e o distúrbio na homeostase do glutamato captado pelo astrócito pode gerar um desequilíbrio do mesmo, uma disfunção, ou ainda, morte neuronal (WALTON; DODD, 2007).

### **3.4 Metabolismo da glicose**

A glicose é reconhecida como um substrato energético predominante e essencial para o encéfalo adulto em condições fisiológicas (BOUZIER-SORE et al., 2006). Em média, um encéfalo adulto é responsável por 2% do peso total do corpo, sendo que consome 20% do oxigênio do organismo e 25% da glicose corporal em um estado de vigília e em repouso (BÉLANGER et al., 2011). Além de ser o principal substrato energético, no SNC, a glicose é fonte essencial para o glutamato (BÉLANGER et al., 2011), síntese e reciclagem de glutatona (RUSSELL et al., 1999) e síntese de lipídios (MAGNUM et al., 2015).

A entrada de glicose no tecido cerebral ocorre via transportadores 1 (GLUT-1, nas células endoteliais e astrócitos) e 3 (GLUT-3, em neurônios) e ocorre de forma independente de insulina (CHEN; ZHONG, 2013). Mesmo a glicose direcionada aos astrócitos, via GLUT-1, é armazenada na forma de glicogênio ou convertida a lactato. Em situações de alta demanda energética pode ser transportada aos neurônios via

GLUT-3, como substrato energético, sendo denominado de transporte lactato-neurônio (Figura 3) (OSBORN et al., 2015).

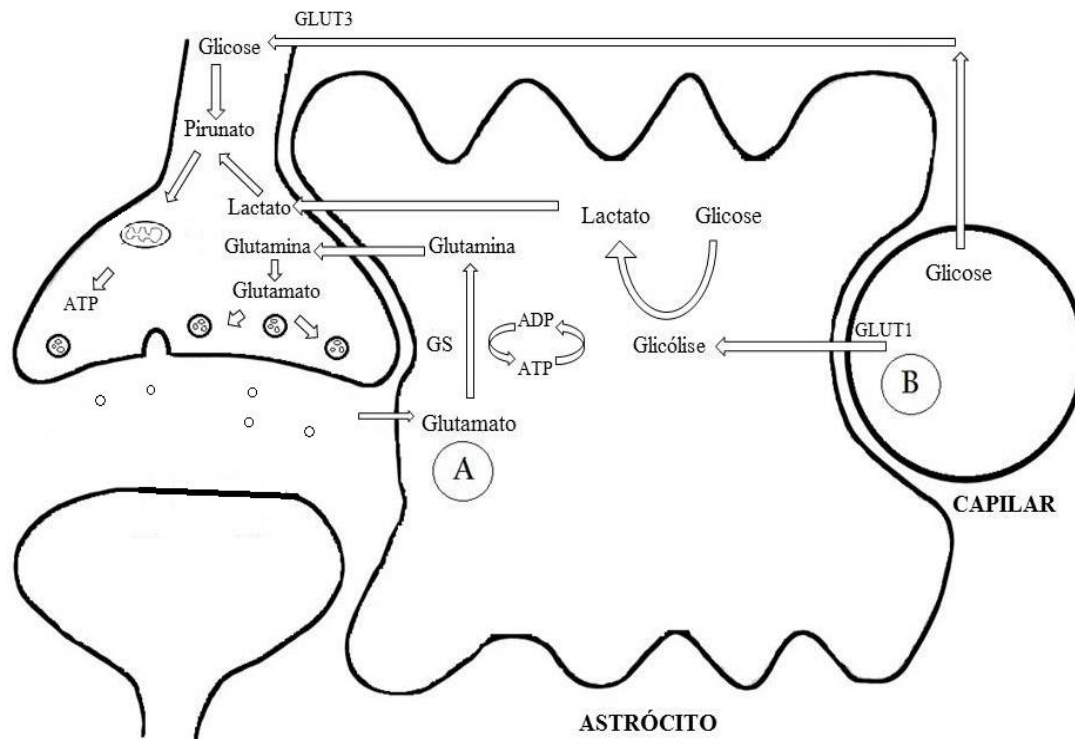


Figura 3: Astrócito e sua participação na sinapse tripartite e barreira hematoencefálica. (A) Captação de glutamato para o astrócito, com sua subsequente conversão em glutamina e seu transporte para o neurônio, sendo convertida novamente em glutamato; (B) Captação de glicose a partir do capilar para o astrócito através do GLUT-1, onde será convertida a lactato e transportada ao neurônio, ou a glicose pode ser transportada diretamente ao neurônio através da GLUT-3. Adaptado de Magistretti & Pellerin, 1999.

A partir de estudos prévios, sabe-se que a captação de glicose no encéfalo de pacientes com DA está prejudicada (FREEMANTLE et al., 2006) e, pelo menos em parte, esse prejuízo é causado por uma redução na captação da glicose glial (EROL, 2008). Desta forma, os astrócitos desempenham um papel vital em ajustar o transporte da glicose e manter a homeostase energética cerebral, que facilmente retira a glicose do sangue através de células endoteliais e fornece esse substrato metabólico energético aos neurônios (EROL, 2008; PEKONY et al., 2016).

Estudos têm indicado a DA como uma doença neurodegenerativa metabólica relacionada à idade (CHEN; ZHONG, 2013). O prejuízo no metabolismo da glicose cerebral é uma característica patofisiológica invariante na DA e sua ocorrência parece preceder até em décadas a disfunção cognitiva e alterações patológicas (GRIEB, 2016).

### **3.5 Glutathiona**

A glutathiona é considerada um antioxidante e sua ação auxilia a proteger os neurônios contra o dano oxidativo; onde os precursores para sua síntese são fornecidos pelos astrócitos (ABRAMOV et al., 2003). A glutathiona existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e para a efetividade do papel antioxidante, desempenhado pelos astrócitos, é necessário o equilíbrio entre ambas as formas GSH e GSSG, bem como da quantidade sintetizada e do balanço entre consumo e transporte para outras células (HIRRLINGER; DRINGEN, 2010).

A glutathiona na sua forma reduzida (GSH) é o maior antioxidante do cérebro e desta forma, são crescentes as evidências do importante papel que a mesma desempenha na detoxificação no SNC, das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BAINS; SHAW, 1997). Porém, quando ocorre um comprometimento deste sistema antioxidante glial, em condições patológicas, como na DA, pode haver influência na sobrevivência celular. Sabe-se que o conteúdo da GSH diminui com o envelhecimento (CUDKOWICZ et al., 1999) e que o fornecimento de GSH e de seus precursores estão alteradas na DA (CALABRESE et al., 2006). Deste modo, devido a falha deste importante sistema antioxidante do SNC na DA, as células nervosas apresentam-se mais suscetíveis ao dano oxidativo e por sua vez podendo levar a morte celular.

## **4. Bases para os objetivos**



Desta forma, os astrócitos sendo fundamentais na manutenção da homeostase do SNC e os mesmos estarem alterados nas doenças neurodegenerativas, como a DA, faz-se necessário um estudo das possíveis alterações neurogliais no modelo animal de demência induzido pelo ácido ocaídico, possibilitando a investigação da dose e tempo pós-infusão.

Dentre as lacunas na literatura caberia investigar no modelo a fosforilação da tau especificamente no sitio 396, por ser caracterizadamente fibrilogênico, em paralelo com mudanças astrogliais específicas, tais como GFAP, S100B, captação de glutamato e glicose e GS.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar alterações de fosforilação da proteína tau, de parâmetros astrogliais e cognitivos, em modelo animal de demência induzido por administração ICV de ácido ocadáico.

### 2.2 Objetivos específicos

a) Em animais, 3 e 12 semanas após a infusão do ácido ocadáico ICV nas doses de 100 ng e 200 ng:

- Verificar a memória espacial, dependente da integridade hipocampal, por diferentes tarefas (Labirinto aquático de Morris, Labirinto em Y e Localização de objetos);
- Avaliar a fosforilação da proteína tau (na Ser 396), bem como a quantidade total dessa proteína no hipocampo;
- Medir o conteúdo de GFAP e glutatona no hipocampo;
- Avaliar a atividade de captação de glicose e de glutamato e a atividade da glutamina sintetase no hipocampo;
- Medir o conteúdo de S100B no LCE.

b) Em fatias hipocampais incubadas com ácido ocadáico nas doses 0,3 ng/ $\mu$ L e 0,6 ng/ $\mu$ L:

- Avaliar a fosforilação da proteína tau (na Ser 396), bem como a quantidade total dessa proteína;
- Avaliar a secreção de S100B, a captação de glicose e a captação de glutamato.

## PARTE II

## **CAPÍTULO 1**

### **Intracerebroventricular administration of okadaic acid induces hippocampal glucose uptake dysfunction and tau phosphorylation**

Núbia Broetto, Fernanda Hansen, Giovana Brolese, Cristiane Batassini, Franciane Lirio, Fabiana Galland, João Paulo Almeida dos Santos, Márcio Ferreira Dutra, Carlos-Alberto Gonçalves

Manuscrito publicado no periódico *Brain Research Bulletin*



## Research report

# Intracerebroventricular administration of okadaic acid induces hippocampal glucose uptake dysfunction and tau phosphorylation



Núbia Broetto<sup>a</sup>, Fernanda Hansen<sup>b</sup>, Giovana Brolese<sup>a</sup>, Cristiane Batassini<sup>b</sup>, Franciane Lirio<sup>b</sup>, Fabiana Galland<sup>b</sup>, João Paulo Almeida dos Santos<sup>b</sup>, Márcio Ferreira Dutra<sup>c</sup>, Carlos-Alberto Gonçalves<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Neuroscience Post-Graduation Program, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Department of Cellular Biology, Embryology and Genetics, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 February 2016

Received in revised form 19 April 2016

Accepted 20 April 2016

Available online 21 April 2016

## Keywords:

Alzheimer's disease

Glucose uptake

GFAP

Okadaic acid

S100B

Tau phosphorylation

## ABSTRACT

Intraneuronal aggregates of neurofibrillary tangles (NFTs), together with beta-amyloid plaques and astrogliosis, are histological markers of Alzheimer's disease (AD). The underlying mechanism of sporadic AD remains poorly understood, but abnormal hyperphosphorylation of tau protein is suggested to have a role in NFTs genesis, which leads to neuronal dysfunction and death. Okadaic acid (OKA), a strong inhibitor of protein phosphatase 2A, has been used to induce dementia similar to AD in rats. We herein investigated the effect of intracerebroventricular (ICV) infusion of OKA (100 and 200 ng) on hippocampal tau phosphorylation at Ser396, which is considered an important fibrillogenic tau protein site, and on glucose uptake, which is reduced early in AD. ICV infusion of OKA (at 200 ng) induced a spatial cognitive deficit, hippocampal astrogliosis (based on GFAP increment) and increase in tau phosphorylation at site 396 in this model. Moreover, we observed a decreased glucose uptake in the hippocampal slices of OKA-treated rats. *In vitro* exposure of hippocampal slices to OKA altered tau phosphorylation at site 396, without any associated change in glucose uptake activity. Taken together, these findings further our understanding of OKA neurotoxicity, *in vivo* and *in vitro*, particularly with regard to the role of tau phosphorylation, and reinforce the importance of the OKA dementia model for studying the neurochemical alterations that may occur in AD, such as NFTs and glucose hypometabolism.

© 2016 Published by Elsevier Inc.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia, is an age-related neurodegenerative disorder, characterized clinically by loss of memory and personality changes and histopathologically by the presence of the extraneuronal accumulation of beta-amyloid peptides in plaques, intraneuronal aggregates of neurofibrillary tangles (NFTs) and astrogliosis in neocortical and hippocampal tissues (Feany and Dickson, 1996; Raskin et al., 2015; Stephan et al., 2001). The underlying mechanism of sporadic AD remains poorly understood, but it has been shown that abnormal hyperphosphorylation of tau leads to aggregation, formation of NFTs, microtubule

disruption, neuronal dysfunction and death (Brandt et al., 2005; Li et al., 2007).

It is well established that brain glucose uptake/metabolism is impaired in AD (Cunnane et al., 2011) and it has been proposed that this impairment is linked to abnormal hyperphosphorylation of tau (Gong et al., 2006). In this scenario, astrocytes are key elements, particularly because changes in glucose uptake and/or glutamate uptake affect neuronal function and survival [see Steele and Robinson, 2012 for a review].

Several transgenic and non-transgenic animal models have been proposed for studying the genesis of AD, where each model allows us to investigate specific aspects of this disease, its different phases and even possible therapeutic strategies (Puzzo et al., 2015). To specifically investigate NFTs, several transgenic models have been developed [see (Brandt et al., 2005) for a review], while non-transgenic models include the intracerebroventricular (ICV) or intrahippocampal infusion of okadaic acid (OKA) (Costa et al., 2012; Kamat et al., 2010).

\* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: [casg@ufrgs.br](mailto:casg@ufrgs.br) (C.-A. Gonçalves).

OKA is a selective inhibitor of the serine/threonine phosphatases 2A (predominantly) and 1 (Arias et al., 1998), which mediate the phosphorylation of the tau protein and, therefore, neuronal cell death *in vitro* (Cagnoli et al., 1996) and *in vivo* (He et al., 2001). Importantly, it has been shown that the activity of protein phosphatase 2A (PP2A) is decreased in the brains of AD patients (Zhou et al., 2008). Based on this and other evidence, PP2A has been suggested to be a putative molecular target in the treatment of Alzheimer's disease (Voronkov et al., 2011).

Using a model of intrahippocampal OKA-injection in rats we observed behavioral and neuroglial alterations (Costa et al., 2012) in these animals. Our findings indicated significant hippocampal changes, including gliosis (based on the increased GFAP content) with a reduction in glutamine synthetase (GS), an enzyme responsible for the recycling of glutamate for glutamatergic transmission. Moreover, we found an activation of p38 MAPK in this model, an enzyme putatively involved in the phosphorylation of tau and elevated in AD (Munoz and Ammit, 2010; Pei et al., 2003).

*In vitro* phosphorylation of tau occurs at multiple sites and appears to be required to convert it into the altered protein [see (Stoothoff and Johnson, 2005), for a review]. Phosphorylation at Ser262 and Thr231/Ser235 seems to regulate tau microtubule interactions. Under pathological conditions, tau hyperphosphorylation at the critical microtubule regulatory sites leads to increased levels of free tau, which result in further tau phosphorylation at fibrillogenic sites (e.g. Ser396/404).

In this study, we employed a model of ICV-OKA administration to investigate tau phosphorylation (at Ser396) and other biochemical changes commonly associated with cognitive impairment, including glucose uptake, gliosis markers (GFAP and S100B) and parameters related to glutamate metabolism (glutamate uptake, GS and glutathione (GSH) content). Moreover, we investigated whether OKA has a direct effect on tau phosphorylation and other biochemical parameters in acute hippocampal slices.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

Forty-seven adult male Wistar rats (300–380 g, 100 days old) were obtained from our breeding colony (Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil) and were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with free access to food and water. All animal experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications no. 80-23) and followed the regulations of the local animal house authorities (UFRGS, no. 20356).

### 2.2. Surgical procedures

To analyze the *in vivo* effect of okadaic acid (OKA; from Calbiochem), thirty-eight animals were divided into three groups: sham/vehicle ( $n = 12$ ), 100 ng OKA ( $n = 13$ ) and 200 ng OKA ( $n = 13$ ) groups. Cognitive evaluations were performed between 14 and 20 days after OKA administration, and on day 21 after OKA administration, rats were anesthetized for cerebrospinal fluid (CSF) puncture. Then animals were euthanized by decapitation and hippocampal samples were obtained for biochemical analyses.

OKA was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 0.29 mM and diluted to an appropriate concentration in phosphate buffer saline (D-PBS, 16% of DMSO). Briefly, on the day of the surgery, animals were anesthetized with ketamine/xylazine (80 and 10 mg/kg, respectively, intraperitoneally) and placed in a

stereotaxic apparatus. A midline sagittal incision was made in the scalp. Burr holes were drilled in the skull on both sides over the lateral ventricles. The lateral ventricles were accessed using the following coordinates (Tramontina et al., 2011): 0.9 mm posterior to bregma; 1.5 mm lateral to sagittal suture; 3.6 mm beneath the surface of the brain. Rats received a bilateral infusion, in a total volume of 10  $\mu\text{L}$ , of OKA (10 ng/ $\mu\text{L}$  or 20 ng/ $\mu\text{L}$ ) or vehicle (D-PBS) using a microsyringe (Hamilton, USA). After the surgical procedure, rats were placed on a heating pad to maintain body temperature at  $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  and were kept there until recovery from anesthesia. No mortality was observed in either of the groups.

### 2.3. Cognitive and motor evaluation

Fourteen days after surgery, rats were submitted to training in the Morris water maze (Morris, 1984). The apparatus consisted of a circular pool (180 cm diameter, 60 cm high) filled with water (depth 30 cm;  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), placed in a room with consistently located spatial cues. An escape platform (10 cm diameter) was placed in the middle of one of the quadrants, 1.5 cm below the water surface, equidistant from the sidewall and the middle of the pool. The platform provided the only escape from the water and was located in the same quadrant every trial. Four different starting positions were equally spaced around the perimeter of the pool. On each training day, all four start positions were used once in a random sequence, i.e., four training trials per day. A trial began by placing the animal in the water facing the wall of the pool at one of the starting points. If the animal failed to escape within 60 s it was gently conducted to the platform by the experimenter. The rat was allowed to stay there for 20 s. The inter-trial interval was 10 min. After each trial, the rats were dried, and returned to their cages at the end of the session. Animals were trained for 6 days. 24 h after the last training session, the rats were submitted to a test session. Before this session, the submerged platform was removed. The retention test consisted of placing the animals in the water for 1 min. On the day of the test, animals were placed in the opposite quadrant to where the time to find the platform and speed were measured. The data were analyzed with ANY-maze software version 4.99.

### 2.4. Collection of cerebrospinal fluid and hippocampal slices

Animals were anesthetized as previously described and then positioned in a stereotaxic holder and cerebrospinal fluid (CSF) was obtained by cisterna magna puncture. The puncture was performed using an insulin 0.5 mL syringe and 31 G needle (0.25 mm diameter, 6 mm length). CSF samples were frozen ( $-80^\circ\text{C}$ ) until S100B measurement (Guerra et al., 2011; Rodrigues et al., 2009). The animals were killed by decapitation, the brains were removed and placed in cold sodium phosphate buffer with the following composition (in mM): 51.33 NaCl, 19.13  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 81.01  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4. The left hippocampi were dissected and quickly frozen in liquid nitrogen and stored in  $-80^\circ\text{C}$  until western blotting analysis. The right hippocampi were chopped obtained transverse slices of 0.3 mm using a McIlwain Tissue Chopper (Nardin et al., 2009). Hippocampal slices were transferred immediately to 24-well culture plates for measuring glutamate and glucose uptake or frozen ( $-80^\circ\text{C}$ ) for other biochemical analysis (GFAP, GSH content and glutamine synthetase activity) as subsequently described.

### 2.5. Western blotting analysis for tau content and phosphorylation

Hippocampal slices were homogenized in sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v)  $\beta$ -mercaptoethanol and 0.002% bromophenol blue) and proteins were separated by SDS-PAGE on 10% (w/v) acrylamide gels and

electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 137 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20) containing 5% (w/v) milk for 1 h at room temperature. Subsequently, the membranes were incubated overnight with the appropriate primary antibodies: anti-phospho-Tau (Ser396), clone PHF13 (dilution 1:1000) (Merck Millipore); anti-Tau, clone Tau 7 (dilution 1:1000) (Merck Millipore); or anti- $\beta$ -actin (dilution 1:2000) (Sigma Aldrich). Membranes were then rinsed with TBS-T, and exposed to horseradish peroxidase-linked anti-IgG antibodies for 2 h at room temperature. Chemiluminescent bands were detected using a chemiluminescence ECL kit (GE Healthcare) and captured in an ImageQuant LAS400 (GE). Densitometry analyses were performed using Image-J software. The results were expressed as percentages of the control and the levels of phosphorylation were determined as a ratio of phospho-Tau ser396/Total Tau.

## 2.6. GFAP content

Enzyme-linked immunosorbent assay for GFAP was carried out, as previously described (Tramontina et al., 2007), by coating the microtiter plate with 100  $\mu$ L diluted samples or standard human GFAP (Calbiochem) ranging from 0.1 to 5 ng for 24 h at 4 °C. Incubation with a rabbit polyclonal anti-GFAP (Dako) for 1 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature (GE). A colorimetric reaction with o-phenylenediamine (Sigma) was measured at 492 nm. Data were calculated as ng/ $\mu$ g total protein.

## 2.7. S100B measurement

S100B was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay, as previously described (Leite et al., 2008). Briefly, 50  $\mu$ L of sample plus 50  $\mu$ L of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated overnight with monoclonal anti-S100B (SH-B1) antibody (Sigma). Polyclonal anti-S100 antibody (Dako) and peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (GE) were incubated at the same time for 30 min at 37 °C. The microtiter plate was rinsed three times with a wash solution between each step of the technique. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine (Sigma) was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL. Data were calculated as ng/mL.

## 2.8. Glutamate uptake assay

Glutamate uptake was performed as previously described (Thomazi et al., 2004). Slices were incubated at 37 °C in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26CaCl<sub>2</sub>, 0.41 MgSO<sub>4</sub>, 0.49 MgCl<sub>2</sub>, 0.63 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.17 NaHCO<sub>3</sub> and 5.6 glucose, pH 7.2. The assay was started by the addition of 0.1 M L-glutamate and 0.33  $\mu$ Ci/mL L-[2,3-<sup>3</sup>H] glutamate (Amersham International). The incubation was stopped after 5 min by removing the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed in a 0.5 M NaOH solution. Sodium-independent uptake was determined using N-methyl-D-glucamine (Sigma) instead of NaCl. Sodium-dependent glutamate uptake was obtained by subtracting the non-specific uptake from the total uptake to obtain the specific uptake. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Results were calculated as nmol/mg protein/min.

## 2.9. Glutamine synthetase(GS) activity

The enzymatic activity of GS was determined using procedures described previously (Minet et al., 1997), with modifications. Briefly, slices were homogenized in 50 mM imidazole.

Homogenates were incubated with (mM): 50 imidazole, 50 hydroxylamine, 100 L-glutamine, 25 sodium arsenate dibasic heptahydrate, 0.2 ADP, 2 manganese chloride, pH 6.2 for 15 min at 37 °C. The reactions were terminated by the addition of 0.2 mL of 0.37 M FeCl<sub>3</sub>, 200 mM trichloroacetic acid, and 67 mM HCl. After centrifugation, the absorbance of the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of  $\gamma$ -glutamylhydroxamate acid treated with ferric chloride reagent. GS activity was expressed as  $\mu$ mol/mg protein/h.

## 2.10. Glucose uptake assay

Glucose uptake was measured as previously described (Pellerin and Magistretti, 1994), with modifications (Hansen et al., 2016). Hippocampal slices were incubated at 35 °C in HBSS (described above). The assay was initiated by the addition of 0.1  $\mu$ Ci/well Deoxy-D-glucose, 2-[<sup>3</sup>H(G)]. The incubation was stopped after 30 min by removing the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed in a solution containing 0.5 M NaOH. Glucose uptake was calculated by subtracting the non-specific uptake, obtained by the glucose transporter inhibitor, cytochalasin B (10  $\mu$ M), from the total uptake in order to obtain the specific uptake. Radioactivity was measured using a scintillation counter. Results were calculated as nmol/mg protein/min.

## 2.11. Glutathione (GSH) content assay

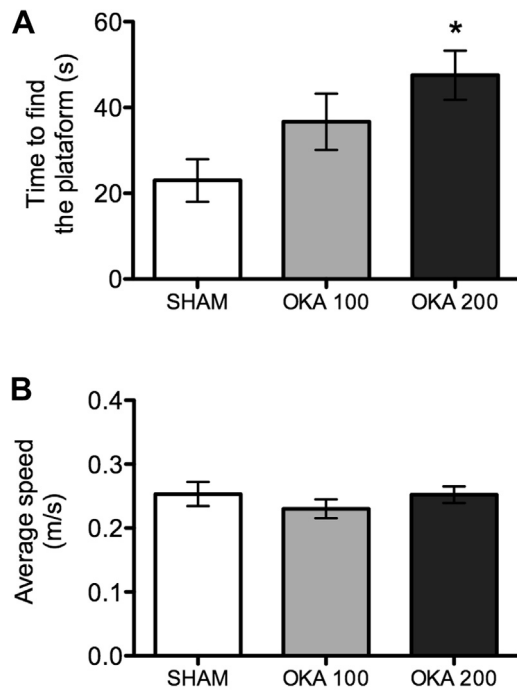
Intracellular GSH levels (nmol/mg protein) were measured as previously described (Browne and Armstrong, 1998). This assay detects only the reduced glutathione content. Slices were diluted in ten volumes of 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with o-phthalaldehyde (1 mg/mL methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was employed using standard GSH solutions (0–500  $\mu$ M). Results were calculated as nmol/mg protein.

## 2.12. Protein determination

Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as standard (Peterson, 1977).

## 2.13. In vitro effect of OKA in hippocampal slices

To analyze the direct and acute effect of the OKA in hippocampal slices, other nine (n=9) adult male rats were used. Animals were killed by decapitation, the brains were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgSO<sub>4</sub>; 25 HEPES; 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 10 glucose, adjusted to pH 7.4. The hippocampi were dissected and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper. Slices were then transferred into 24-well culture plates, each well containing 0.3 mL of appropriate media for glutamate uptake or glucose uptake assay (as described in Sections 2.8 and 2.10, respectively) or protein phosphorylation assay, containing OKA 0.3 ng/ $\mu$ L or OKA 0.6 ng/ $\mu$ L or vehicle (DMSO at final concentration of 0.5%). For protein phosphorylation assay, slices were incubated in saline medium for 60 min, at 30 °C (Ziegler et al., 2002) and tau phosphorylation content was determined by western blotting (as described in Section 2.5). Amounts of OKA for *in vitro* experiments were chosen based on amount injected *in vivo* (100 and 200 ng in a putative CSF volume of 300  $\mu$ L in rats) (Consiglio and Lucion, 2000). Integrity



**Fig. 1.** Cognitive and motor performance of rats submitted to OKA-intracerebroventricular infusion. Male Wistar rats were anesthetized and vehicle (Sham) or OKA (at 100 or 200 ng) was ICV injected. Cognitive and motor performance was evaluated 3 weeks afterwards in the Morris water maze. In A: Time (measured in seconds) to find the platform on day of test, after 6 days of training. In B: Average speed (m/s) during test. Values are mean  $\pm$  standard error of 7–9 rats in each group. \*Significant differences from the sham group (One-way ANOVA followed by Tukey's test,  $p < 0.05$ ).

and viability of the slice preparations were evaluated by LDH and MTT assays (Nardin et al., 2009) (data not shown).

#### 2.14. Statistical analysis

Data are reported as means  $\pm$  standard error and analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ . All analyses were performed using the SPSS software package 20.0.

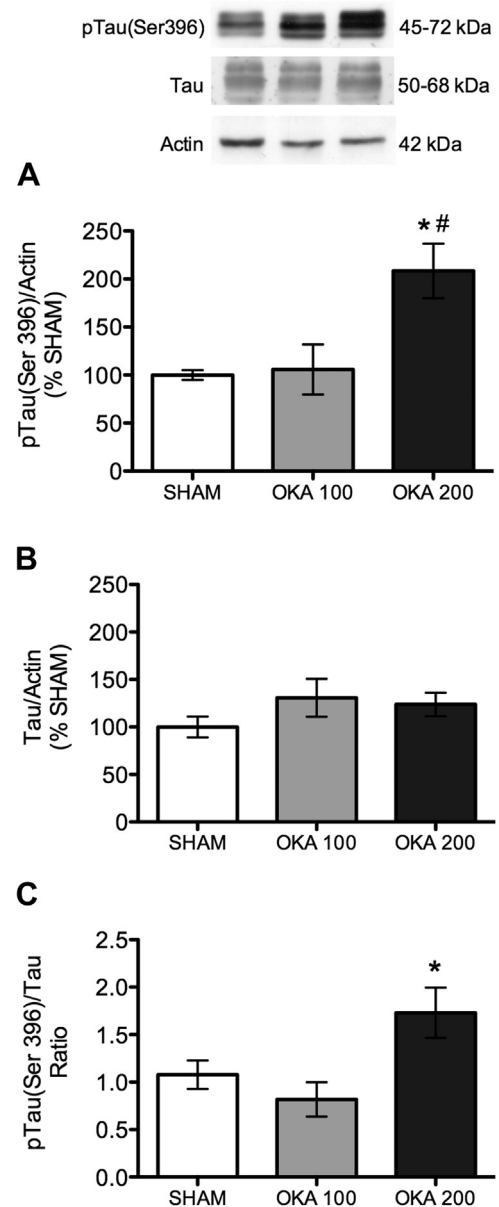
### 3. Results

#### 3.1. Cognitive and motor performance

The Morris water maze was used to evaluate cognitive impairment with ICV administration in the groups: Sham, 100 ng OKA and 200 ng OKA. In the training sessions (started 2 weeks after OKA administration), a significant decline was observed in the average time to find the platform (escape latency) (data not shown). In the trial session, the time to find the platform was significantly higher in the group that received 200 ng OKA (Fig. 1A, one way ANOVA,  $F(2, 20) = 4.554$ ,  $p = 0.02$ ). The use of ANY-Maze to analyze the locomotor activity (immobility time, travelled distance and speed) showed that OKA-treated rats exhibit similar mobility when compared with the sham group. Speed data is presented in Fig. 1B (one way ANOVA,  $F(2, 18) = 0.688$ ,  $p = 0.5$ ).

#### 3.2. Tau content and phosphorylation

A significant increase in the phospho-tau immunocent (one-way ANOVA,  $F(2, 14) = 7.379$ ,  $p = 0.006$ ) of the hippocampus was



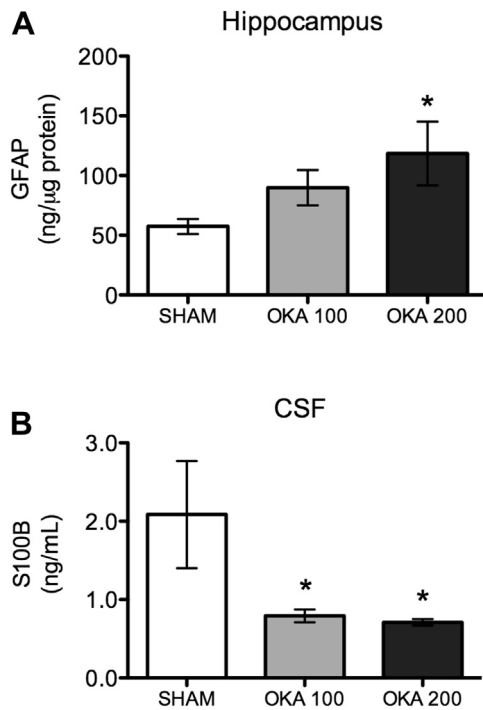
**Fig. 2.** Content and phosphorylation of tau protein in rats submitted to OKA-intracerebroventricular infusion. Male Wistar rats were anesthetized and vehicle (Sham) or OKA (at 100 or 200 ng) was ICV injected. Neurochemical analysis was performed 3 weeks afterwards. Hippocampal slices were analyzed by SDS-PAGE and western blotting. In (A) phosphorylated tau at Ser396; In (B) total tau content; and in (C) phosphorylated tau/Total tau ratio. Representative images of blots of phosphorylated tau, tau and beta actin were inserted in the top of panels. Values are mean  $\pm$  standard error of 5–6 rats in each group. \*Significantly different from the sham group. #Significantly differences from the OKA 100 group (One-way ANOVA followed by Tukey's test,  $p < 0.05$ ).

observed in treated rats with ICV-OKA at 200 ng, but not at 100 ng (Fig. 2A). However, we did not observe differences in the amount of total tau among the groups (Fig. 2B,  $F(2, 14) = 1.158$ ,  $p = 0.34$ ). The phospho-tau/tau ratio demonstrates a clear increase in tau phosphorylation following 200 ng OKA administration (Fig. 2C,  $F(2, 14) = 5.384$ ,  $p = 0.01$ ).

#### 3.3. Hippocampal GFAP and CSF S100B

The GFAP content was increased in the rat hippocampus at 3 weeks after ICV-OKA at 200 ng (Fig. 3A,  $F(2, 26) = 3.58$ ,  $p = 0.04$ ). No change was observed in the hippocampal S100B content after





**Fig. 3.** Hippocampal GFAP and cerebrospinal fluid S100B of rats submitted to OKA-intracerebroventricular infusion. Wistar rats were anesthetized and vehicle (Sham) or OKA (at 100 or 200 ng) was ICV injected. Neurochemical analysis was performed 3 weeks afterwards. In (A) hippocampal slices were homogenized and GFAP content was measured by ELISA. In (B) cerebrospinal fluid (CSF) was collected by cisterna magna puncture and the S100B was measured by ELISA. Values are mean  $\pm$  standard error of 7–11 rats in each group. \*Significantly different from the sham group. (One-way ANOVA followed by Tukey's test,  $p < 0.05$ ).

this treatment (data not shown); however a decrease in CSF S100B was observed (Fig. 3B,  $F(2, 22) = 4.889$ ,  $p = 0.018$ ) in both groups of OKA-treated rats.

#### 3.4. Glutamate uptake and GS activity

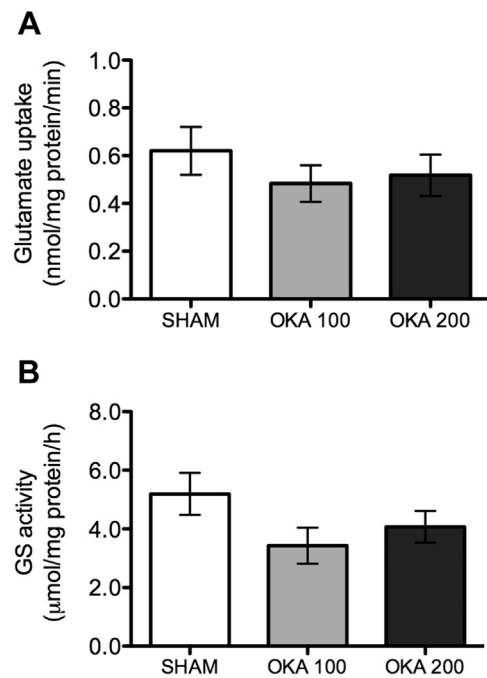
Glutamate uptake (predominantly) and glutamate synthetase (exclusively) are markers of astroglial activity. After ICV-OKA, we observed an apparent (not significantly) decrease in glutamate uptake (Fig. 4A,  $F(2, 11) = 0.6200$ ,  $p = 0.5557$ ) and in glutamate synthetase (Fig. 4B,  $F(2, 35) = 1.881$ ,  $p = 0.1675$ ), at both concentrations of OKA.

#### 3.5. Glucose uptake and GSH content

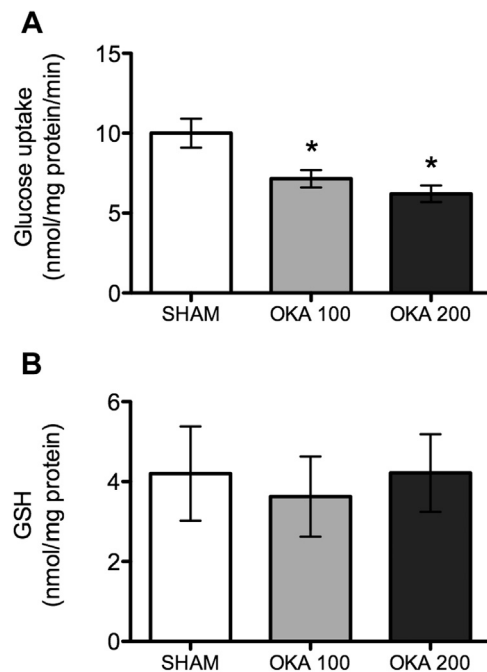
Astrocytes synthesize GSH, and also recycle it using NADPH from the pentose pathway. Part of the GSH is exported and its product (cysteinylglycinepeptide) is taken up and used by neurons to synthesize its own GSH. Hippocampal glucose uptake was reduced in rats treated with ICV-OKA at 200 ng (Fig. 5A,  $F(2, 33) = 7.244$  and  $p = 0.0025$ ), suggesting a decrease in glucose uptake. However, no changes were observed in the hippocampal content of GSH (Fig. 5B,  $F(2, 21) = 0.1021$  and  $p = 0.9034$ ).

#### 3.6. In vitro effect of OKA on tau phosphorylation

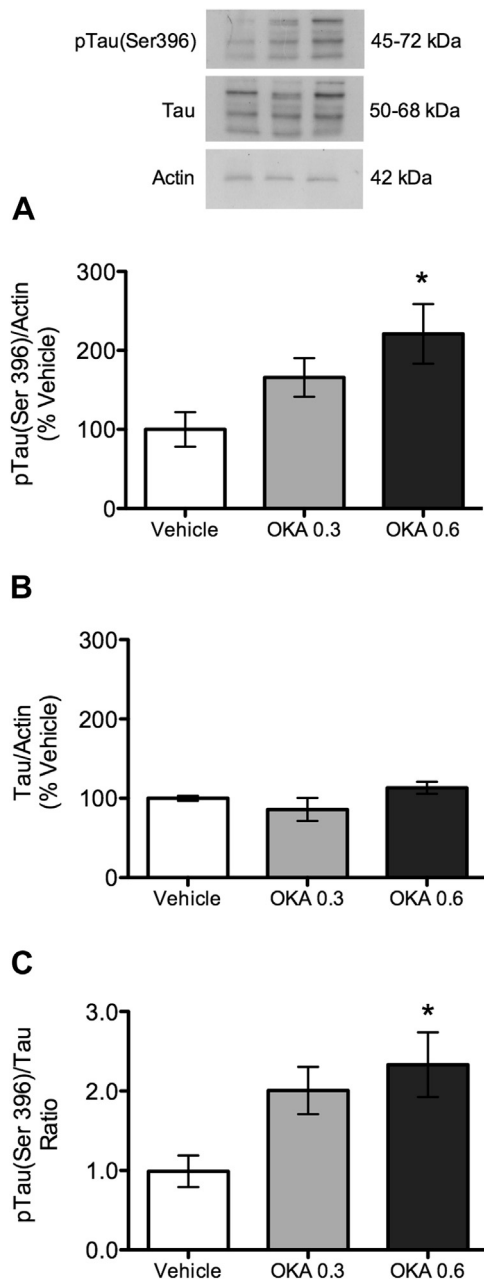
Acute hippocampal slices were incubated for 1 h with OKA at concentrations of 0.3 and 0.6 ng/ $\mu$ L, in order to investigate a direct effect on tau phosphorylation at Ser396. A significant increase in phosphorylated tau (Fig. 6A,  $F(2, 12) = 4.413$ ,  $p = 0.0366$ ) was observed in hippocampal slices incubated with 0.6 ng/ $\mu$ L OKA. As expected, we did not observe changes in the amount of total tau



**Fig. 4.** Glutamate uptake and glutamine synthetase (GS) activity in the hippocampus of rats submitted to OKA-intracerebroventricular infusion. Wistar rats were anesthetized and vehicle (Sham) or OKA (at 100 or 200 ng) was ICV injected. Neurochemical analysis was performed 3 weeks afterwards. In (A) hippocampal slices of 0.3 mm in thickness were incubated with  $^3\text{H}$ -glutamate for measurement of glutamate uptake. In (B) GS activity was measured in homogenized hippocampal slices. Values are mean  $\pm$  standard error of 4–5 rats in each group in glutamate uptake assays and 10–13 in each group in GS assays. No differences were found between groups. One-way ANOVA followed by Tukey's test,  $p < 0.05$ .



**Fig. 5.** Glucose uptake and glutathione (GSH) content in the hippocampus of rats submitted to OKA-intracerebroventricular infusion. Wistar rats were anesthetized and vehicle (Sham) or OKA (at 100 or 200 ng) was ICV injected. Neurochemical analysis was performed 3 weeks afterwards. In (A) hippocampal slices of 0.3 mm thickness were incubated with  $^3\text{H}$ -glucose for measurement of glucose uptake. In (B) GSH was measured in homogenized hippocampal slices. Values are mean  $\pm$  standard error of 8–10 rats in each group. \*Significantly different from the sham group (One-way ANOVA followed by Tukey's test,  $p < 0.05$ ).

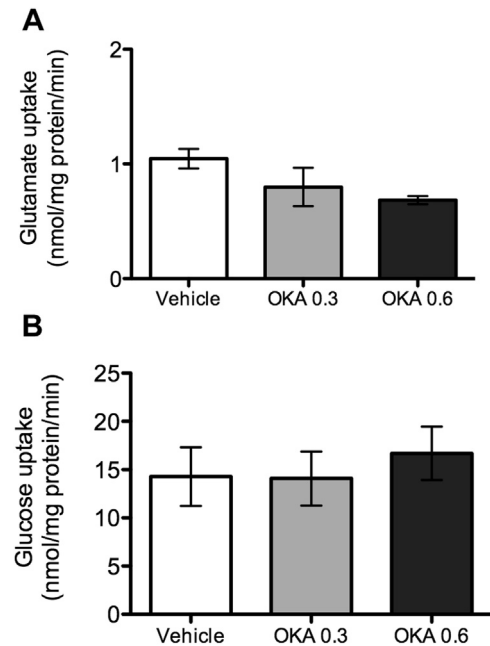


**Fig. 6.** Content and phosphorylation of tau protein in hippocampal slices incubated with OKA. Hippocampal slices of male Wistar rats were incubated with OKA (0.3 or 0.6 ng/mL) for 1 h and analyzed by SDS-PAGE and western blotting In (A) phosphorylated tau at Ser 396; in (B) total tau content; and in (C) phosphorylated tau/Total tau ratio. Representative images of blots of phosphorylated tau, tau and beta actin were inserted in the top of panels. Values are mean  $\pm$  standard error of 4–5 experiments in each group. \*Significantly different from the sham group (One-way ANOVA followed by Tukey's test,  $p < 0.05$ ).

(Fig. 6B,  $F(2, 12) = 1.750$ ,  $p = 0.2154$ ). However, significant increases in the phospho-tau/tau ratio were induced by 0.3 and 0.6 ng/ $\mu$ L OKA (Fig. 6C,  $F(2, 12) = 6.078$ ,  $p = 0.0167$ ). The integrity and viability of these slices were evaluated and confirmed by LDH and MTT assays, respectively (data not shown).

### 3.7. In vitro effect of OKA on glucose and glutamate uptake

OKA incubation did not directly affect glutamate (Fig. 7A,  $F(2, 14) = 0.810$ ,  $p = 0.0998$ ) and glucose (Fig. 7B,  $F(2, 23) = 0.1510$ ,  $p = 0.8607$ ) uptake in hippocampal slices. However, a tendency



**Fig. 7.** Glutamate and glucose uptake in hippocampal slices incubated with OKA. Hippocampal slices of male Wistar rats were incubated with OKA (0.3 or 0.6 ng/mL) for 1 h. Slices were then incubated with media containing  $^3\text{H}$ -glutamate or  $^3\text{H}$ -Deoxy-D-glucose for measurement of glutamate uptake (in A) or glucose uptake (in B), respectively. Values are mean  $\pm$  standard error of 5–8 experiments in each group. No differences were found. One-way ANOVA followed by Tukey's test,  $p < 0.05$ .

( $p < 0.10$ ) towards a reduction in glutamate uptake occurred in slices incubated with OKA at 0.6 ng/ $\mu$ L.

## 4. Discussion

Epidemiological studies reveal the growing importance of dementias in public health, particularly AD, with consequently high social and economic impacts (Chatterjee et al., 2016; Prince et al., 2013). Causes of this neurodegenerative disease remain unknown. Among the histopathological markers of AD are amyloid plaques (due to the deposition of beta amyloid peptide) and aggregates of NFTs (due to hyperphosphorylation of the tau protein) (Goedert and Spillantini, 2006; Silvestrelli et al., 2006). The mechanism(s) leading to hyperphosphorylation of tau or even beta amyloid deposition are unclear, but brain glucose hypometabolism appears to precede these alterations in AD (Mosconi et al., 2009; Weinstock and Shoham, 2004). In fact, models based on reduced glucose uptake/metabolism have been widely used to study AD and to propose therapeutic strategies (Agrawal et al., 2011; Biasibetti et al., 2013).

In order to specifically investigate NFTs formation, ICV and intrahippocampal infusions of OKA have been used (Costa et al., 2012; Kamat et al., 2010). OKA, a selective inhibitor of serine/threonine phosphatases 1 and 2B, causes phosphorylation of the tau protein and neuron death (Cagnoli et al., 1996; He et al., 2001). Tau phosphorylation occurs at multiple sites [see (Stoothoff and Johnson, 2005), for a review]. Phosphorylation at Ser262 and Thr231/Ser235 regulate tau microtubule interactions, but the hyperphosphorylation of these sites, under pathological conditions, favors tau dissociation from microtubules and its subsequent phosphorylation at sites Ser396/404, considered as fibrillogenic sites.

Protein phosphatases 2A and 2B dephosphorylate tau at Ser396, but PP2A also dephosphorylates tau at additional sites. In fact, in the rat brain, PP2A has major activity at tau phosphorylated sites, and targets several protein kinases (Lee et al., 2001).

In the OKA-induced model dementia, hyperphosphorylation at Ser262 has been described (Kamat et al., 2013). Herein, we investigated tau phosphorylation, induced by OKA, at site Ser396 in hippocampal slices from rats treated with ICV-OKA and acute hippocampal slices of untreated rats. In both conditions we observed an increase in tau phosphorylation without significant changes in the tau content. To our knowledge, this is the first time that the increase in phosphorylation has been shown at this site in the OKA-induced model of dementia. These data, together with evidence of cognitive impairment in these animals, support the use of the OKA model as a useful tool for the study of AD genesis. Moreover, to date, no direct data regarding hippocampal glucose metabolism have been reported in the OKA-induced model of dementia.

Herein, we observed a decrease in glucose uptake in ICV-OKA treated rats, a finding that is also of importance to validate this model for AD. As mentioned, brain hypometabolism of glucose appears to precede cognitive impairment and explain, in part, the elevated risk for AD reported in diabetic patients (Agrawal et al., 2011; Chen and Zhong, 2013; Weinstock and Shoham, 2004). However, OKA exposure was not able to induce changes in glucose uptake in acute hippocampal slices, as observed in the *in vivo* model. Many variables could be involved in this discrepancy. The simplest idea is that OKA, in our conditions, does not directly affect hippocampal glucose uptake and the *in vivo* effect involves long-term alterations in the expression of transporter(s) or in the regulation of this/these transporter(s). In fact, the effects of OKA are suggested to depend on cell type, time exposure and concentration (Atkinson et al., 2009). OKA (at  $\mu\text{M}$  levels), in the skeletal muscle (Tanti et al., 1991), hepatocytes (Quentmeier et al., 1993) and adipocytes (Li et al., 1996), is able to induce glucose metabolism. On the other hand, OKA at 10 nM was found to protect cortical neurons from oxygen-glucose deprivation (Atkinson et al., 2009), but it could be lethal at concentrations of 40 nM or more (Yi et al., 2005). The mechanisms behind these effects of OKA on glucose metabolism are not fully understood, but involve changes in enzymatic activities (due to the protein phosphorylation status) and protein expression (Valdiglesias et al., 2012).

Using ICV-OKA we observed two signals of astroglial reactivity; an increase in GFAP, a classical marker of gliosis and a decrease in CSF S100B, an alteration that is observed in other models of dementia, such as STZ (Biasibetti et al., 2013; Rodrigues et al., 2009; Tramontina et al., 2011), chronic cerebral hypoperfusion (Vicente et al., 2009) and intrahippocampal OKA injection (Costa et al., 2012). Considering the neurotrophic activity of S100B, its extracellular decrease in these models may reflect the loss of glial capacity to secrete and respond to injury. In fact, a decrease in astroglial activity (including glucose metabolism) has been proposed to represent a preceding event in cases of dementias, particularly AD (Mosconi et al., 2009; Raskin et al., 2015). We may speculate that a decrease in CSF S100B may be a useful and complementary marker for cognitive impairment and dementia.

The most abundant synaptic transmission is glutamatergic type transmission, which is intimately dependent on astroglial activity. Alterations in this type of synapse are involved in all brain diseases, and changes in cognitive behavior in patients and animals models have been associated with alterations in hippocampal glutamatergic communication. In fact, the OKA-induced model of dementia has been shown to cause significant changes in glutamatergic neurotransmission. Intrahippocampal administration of OKA, for example, has been shown to cause a glutamatergic dysfunction that could be prevented by memantine (Zimmer et al., 2012). Elevated levels of CSF glutamate were observed in this model. More recently, the increased expression of two subunits of the NMDA receptors (NR1 and NR2B) has been found to consolidate glutamatergic dysfunction in the ICV-OKA model of dementia (Kamat et al., 2014). Our data reinforce the hypothesis that astrocytes play a role in

glutamatergic communication. Using intrahippocampal OKA, we found a decrease in hippocampal GS (Costa et al., 2012), which was not observed following the ICV-OKA administration described herein. However, if we look at the glutamate uptake/GFAP ratio, where there is a tendency towards a decrease in glutamate uptake in contrast to a clear increase in GFAP (at 200 ng ICV-OKA), it is possible to conceive a reduced capacity of glutamate uptake in glial cells, possibly contributing to the excitotoxicity mediated by NMDA receptors.

A limitation of this work should be highlighted. Oxidative stress was not exhaustively investigated in the current study, as only the reduced glutathione content was determined (measured by its reaction with o-phthalaldehyde), and this parameter was not affected under the conditions used. This contrasts with previous results using ICV-OKA administration that demonstrated a decrease in GSH content, as determined by its reaction with 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (Kamat et al., 2010; Kamat et al., 2014). Moreover, regardless of methodological differences, we also observed a decrease in GSH after intrahippocampal OKA-administration (Costa et al., 2012).

## 5. Conclusions

In summary, ICV infusion of OKA (200 ng) induced a spatial cognitive deficit, a behavioral task dependent on hippocampus integrity, and also induced gliosis in this brain region (based on GFAP increment), similarly to that obtained with a direct hippocampal OKA-lesion (Costa et al., 2012). The decrease in CSF S100B reinforces the idea of glial impairment. Importantly, we observed, for the first time to our knowledge, tau phosphorylation at site 396 in this model, which was directly involved in the genesis of NFTs, an important histological marker for AD characterization. Moreover, we observed a decrease in glucose uptake in the hippocampal slices of OKA treated rats, which is, putatively, a metabolic alteration that precedes and accompanies AD. Additionally, we found a direct effect of OKA incubation on tau phosphorylation at site 396 in hippocampal slices, without any associated change in glucose uptake activity. These findings contribute to our understanding of OKA neurotoxicity, *in vivo* and *in vitro*, particularly with regard to tau phosphorylation. Our data also reinforce the importance of the OKA model of dementia for the generation of neurochemical alterations found in AD, such as NFTs and hypometabolism of glucose.

## Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

## Acknowledgements

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil), Ministry of Education (MEC/CAPES, Brazil), State Foundation for Scientific Research of Rio Grande do Sul (FAPERGS), and National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection (MCT/INCTEN).

## References

- Agrawal, R., et al., 2011. Insulin receptor signaling in rat hippocampus: a study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21, 261–273.
- Arias, C., et al., 1998. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces heat shock protein expression and neurodegeneration in rat hippocampus *in vivo*. *Exp. Neurol.* 153, 242–254.
- Atkinson, T., Whitfield, J., Chakravarthy, B., 2009. The phosphatase inhibitor okadaic acid, strongly protects primary rat cortical neurons from lethal oxygen-glucose deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 394–398.

- Biasibetti, R., et al., 2013. Green tea (–)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behav. Brain Res.* 236, 186–193.
- Brandt, R., Hundelt, M., Shahani, N., 2005. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 331–354.
- Brown, R.W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol. Biol.* 108, 347–352.
- Cagnoli, C.M., et al., 1996. Apoptosis induced in neuronal cultures by either the phosphatase inhibitor okadaic acid or the kinase inhibitor staurosporine is attenuated by isoquinolinesulfonamides H-7H-8, and H-9. *J. Mol. Neurosci.* 7, 65–76.
- Chatterjee, S., et al., 2016. Type 2 diabetes as a risk factor for dementia in women compared with men: a pooled analysis of 2.3 million people comprising more than 100,000 cases of dementia. *Diabetes Care* 39, 300–307, <http://dx.doi.org/10.2337/dc15-1588>, Epub 2015 Dec 17.
- Chen, Z., Zhong, C., 2013. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Prog. Neurobiol.* 108, 21–43.
- Consiglio, A.R., Lucion, A.B., 2000. Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 5, 109–114.
- Costa, A.P., et al., 2012. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behav. Brain Res.* 226, 420–427.
- Cunneane, S., et al., 2011. Brain fuel metabolism aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition* 27, 3–20.
- Feany, M.B., Dickson, D.W., 1996. Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review. *Ann. Neurol.* 40, 139–148.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science* 314, 777–781.
- Gong, C.X., et al., 2006. Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation. *J. Alzheimers Dis.* 9, 1–12.
- Guerra, M.C., et al., 2011. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J. Neuroinflamm.* 8, 128.
- Hansen, F., et al., 2016. Methylglyoxal and carboxyethyllysine reduce glutamate uptake and S100B secretion in the hippocampus independently of RAGE activation. *Amino Acids* 48, 375–385.
- He, J., et al., 2001. Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *J. Neural Transm. (Vienna)* 108, 1435–1443.
- Kamat, P.K., et al., 2010. Okadaic acid (ICV) induced memory impairment in rats: a suitable experimental model to test anti-dementia activity. *Brain Res.* 1309, 66–74.
- Kamat, P.K., Rai, S., Nath, C., 2013. Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *Neurotoxicology* 37, 163–172.
- Kamat, P.K., et al., 2014. Mechanism of synapse redox stress in okadaic acid (ICV) induced memory impairment: role of NMDA receptor. *Neurochem. Int.* 76, 32–41.
- Lee, V.M., Goedert, M., Trojanowski, J.Q., 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1121–1159.
- Leite, M.C., et al., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99.
- Li, J., Elberg, G., Shechter, Y., 1996. Phenylarsine oxide and vanadate: apparent paradox of inhibition of protein phosphotyrosine phosphatases in rat adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1312, 223–230.
- Li, B., et al., 2007. Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol.* 113, 501–511.
- Minet, R., et al., 1997. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. *Clin. Chim. Acta* 268, 121–132.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Method* 11, 47–60.
- Mosconi, L., et al., 2009. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 36, 811–822.
- Munoz, L., Ammit, A.J., 2010. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 58, 561–568.
- Nardin, P., et al., 2009. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>. *Neurochem. Res.* 34, 1603–1611.
- Pei, J.J., et al., 2003. Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, MEK1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 163, 845–858.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10625–10629.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- Prince, M., et al., 2013. The global prevalence of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement.* 9, 63–75e2.
- Puzzo, D., et al., 2015. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Abeta physiology. *Neuroscience* 307, 26–36.
- Quentmeier, A., et al., 1993. Insulin-mimetic actions of phorbol ester in cultured adult rat hepatocytes: lack of phorbol-ester-elicited inhibition of the insulin signal. *Biochem. J.* 289 (Pt. 2), 549–555.
- Raskin, J., et al., 2015. Neurobiology of Alzheimer's disease integrated molecular, physiological, anatomical, biomarker, and cognitive dimensions. *Curr. Alzheimer Res.* 12, 712–722.
- Rodrigues, L., et al., 2009. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J. Alzheimers Dis.* 17, 193–202.
- Silvestrelli, G., et al., 2006. Treatment of Alzheimer's disease: from pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. *Mech. Ageing Dev.* 127, 148–157.
- Steele, M.L., Robinson, S.R., 2012. Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33 (42), e1–13.
- Stephan, A., Laroche, S., Davis, S., 2001. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J. Neurosci.* 21, 5703–5714.
- Stoothoff, W.H., Johnson, G.V., 2005. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 280–297.
- Tanti, J.F., et al., 1991. Effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases-1 and -2A, on glucose transport and metabolism in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 266, 2099–2103.
- Thomazi, A.P., et al., 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech. Ageing Dev.* 125, 475–481.
- Tramontina, F., et al., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J. Neurosci. Methods* 162, 282–286.
- Tramontina, A.C., et al., 2011. The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats. *J. Neural Transm. (Vienna)* 118, 1641–1649.
- Valdiglesias, V., et al., 2012. Identification of differentially expressed genes in SHSY5Y cells exposed to okadaic acid by suppression subtractive hybridization. *BMC Genom.* 13, 46.
- Vicente, E., et al., 2009. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res.* 1251, 204–212.
- Voronkov, M., Braithwaite, S.P., Stock, J.B., 2011. Phosphoprotein phosphatase 2A: a novel druggable target for Alzheimer's disease. *Future Med. Chem.* 3, 821–833.
- Weinstock, M., Shoham, S., 2004. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism: cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. *J. Neural Transm. (Vienna)* 111, 347–366.
- Yi, K.D., et al., 2005. Role of protein phosphatases in estrogen-mediated neuroprotection. *J. Neurosci.* 25, 7191–7198.
- Zhou, X.W., et al., 2008. Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A. *Neurobiol. Dis.* 31, 386–394.
- Ziegler, D.R., et al., 2002. A ketogenic diet increases protein phosphorylation in brain slices of rats. *J. Nutr.* 132, 483–487.
- Zimmer, E.R., et al., 2012. Pretreatment with memantine prevents Alzheimer-like alterations induced by intrahippocampal okadaic acid administration in rats. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 1182–1190.

## CAPÍTULO 2

### **ICV-okadaic acid-induced model of dementia is spontaneously and partially reverted in long-term**

Núbia Broetto, Fernanda Hansen, Cristiane Batassini, Giovana Brolese, Fabiana Galland, Franciane Lirio, Daniela Fraga de Souza, Márcio Ferreira Dutra, Carlos-Alberto Gonçalves

Manuscrito em preparação a ser submetido na forma de *short communication* ao periódico *Behavioral Brain Research*.

***ICV-okadaic acid-induced model of dementia is spontaneously and partially reverted in long-term***

Núbia Broetto<sup>1</sup>, Fernanda Hansen<sup>2</sup>, Cristiane Batassini<sup>2</sup>, Giovana Brolese<sup>1</sup>, Fabiana Galland<sup>2</sup>, Franciane Lirio<sup>2</sup>, Daniela Fraga de Souza<sup>2</sup>, Márcio Ferreira Dutra<sup>3</sup>, Carlos-Alberto Gonçalves<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

A doença de Alzheimer (DA) é uma das formas mais comuns de demência. As características neuropatológicas são marcadas pela presença de placas senis e da proteína tau associada ao microtúbulo na forma hiperfosforilada, que resulta em emaranhados neurofibrilares (1,2). Além disso, diminuição do metabolismo da glicose, aumento do estresse oxidativo, neuroinflamação e morte de neurônios são encontrados ao longo do processo patológico (3–5).

Promovendo um grau suficiente de analogia, modelos animais são utilizados para o estudo dos mecanismos neuropatológicos da demência (6,7), particularmente buscando mimetizar a doença de Alzheimer do tipo esporádica. A infusão intracerebroventricular (ICV) e intrahipocampal de ácido ocadáico (AO), um potente e seletivo inibidor das proteínas fosfatases 1 e 2A, é um desses modelos. Essa toxina tem demonstrado ser útil para o estudo de aspectos da DA como a hiperfosforilação da proteína tau, astrogliose, disfunção no metabolismo da glicose, estresse oxidativo e prejuízo cognitivo em roedores (8–10). Porém, até o presente momento este modelo foi estudado 3-4 semanas após indução da demência no animal.

Neste estudo, investigamos se o déficit cognitivo, bem como as alterações neuroquímicas, se mantém 12 semanas após a infusão ICV de AO. Foram utilizados dezoito ratos Wistar machos (300-380g, 100 dias de idade) obtidos da colônia local (Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil), os quais foram mantidos em condições ambiente controladas (ciclo claro/escuro de 12 horas em temperatura constante de  $22 \pm 1$  °C) com livre acesso à comida e água. Os experimentos foram conduzidos com a prévia aprovação do Comitê de Ética (UFRGS, 20356). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: veículo (n=9) e ácido ocadáico (AO) (n=9), sendo realizada a cirurgia estereotáxica para infusão ICV de AO (200 ng) como descrito previamente (8).

Na 11ª semana pós-infusão foi realizado o teste de localização de objetos, o qual é baseado na tendência inata que roedores possuem de explorar espontaneamente objetos em um novo local e desta maneira, utilizar a memória espacial para desempenhar tal comportamento (11), o mesmo tem sido utilizado na avaliação de memórias dependentes do hipocampo (12,13). O procedimento consistiu em uma sessão de habituação ao campo aberto com duração de 5 minutos, na qual o animal era colocado na caixa e explorava-a livremente. Após 24 horas, ocorreu a sessão de treino, onde dois objetos idênticos eram apresentados ao animal. Neste momento, foi registrado



o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados no campo aberto, durante 5 minutos. Depois do treino os animais retornavam às suas caixas moradia e aguardavam até o momento do teste, 50 minutos após o treino. No teste um dos objetos era colocado em uma nova posição no campo aberto. Neste momento registrava-se, novamente, o tempo de exploração do objeto que se manteve no mesmo local e o tempo do objeto realocado.

A exploração foi definida conforme os comportamentos de cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Sentar sobre os objetos não foi considerado comportamento exploratório. O índice de reconhecimento em cada sessão foi calculado como: tempo de exploração do objeto na nova posição x100/tempo de exploração de ambos os objetos.

A memória de reconhecimento espacial foi também investigada utilizando o paradigma labirinto em Y. Os animais foram previamente ambientados à sala em que continha o aparato e assim realizado o teste, o qual consistiu de duas etapas, cada uma com duração de 5 minutos e com intervalo de 50 minutos entre cada. O aparato consistiu de três braços fechados, o animal foi posicionado no final de um dos braços, no mesmo braço em ambas as tentativas. Na primeira tentativa um dos braços foi bloqueado, assim o animal possuía dois braços para explorar durante 5 minutos de exposição do mesmo ao aparato. Após 50 minutos, o animal era posicionado novamente no aparato para que o explorasse por 5 minutos, porém nessa segunda tentativa o terceiro braço (novo braço) estava livre ao acesso. Foi gravado o tempo que o animal explorava cada braço.

Ao completar as 12 semanas pós-indução do modelo animal, os mesmos foram previamente anestesiados via intraperitoneal com cetamina/xilasina (80 e 10 mg/kg, respectivamente), posicionados em um aparato estereotáxico e a partir de punção na cisterna magna foi obtido o líquido cerebrospinal (LCE). Após realizada a eutanásia dos mesmos através da decapitação, os hipocampus foram dissecados e obtido fatias hipocampais. As fatias hipocampais foram usadas para medida da captação de glicose, avaliação do conteúdo e fosforilação da proteína tau por *western blotting* e conteúdo de GFAP por ELISA. O conteúdo de S100B no LCE também foi medido por ELISA. Todos os procedimentos metodológicos de avaliação dos parâmetros neuroquímicos foram previamente detalhados (8).

Os resultados estão representados como média  $\pm$  erro padrão ou diferença percentual do grupo controle (veículo), os mesmos foram analisados estatisticamente



pelo teste t, bilateral não pareado, sendo adotando significância de  $p < 0,05$ . Não foram observadas diferenças neuroquímicas entre os animais controles e os tratados com AO (dados não mostrados), exceto na captação de glicose que se mostrou reduzida nos animais tratados com AO. O déficit cognitivo também persistiu de acordo com o teste de localização de objetos. No entanto, a memória avaliada no labirinto em Y estava intacta nos grupos tratado com AO (dados não mostrados). A Tabela 1 compara os dados obtidos nos modelos com AO 3 e 12 semanas após a administração ICV.

**Tabela 1** Alterações comportamentais e neuroquímicas hipocampais em 3 e 12 semanas pós-infusão ICV de ácido ocadáico

Variáveis estudadas	3 semanas pós-infusão <sup>a</sup>	12 semanas pós-infusão
<b>GFAP</b>	↑107 % *	~
<b>S100B (LCE)</b>	↓65 % *	~
<b>Déficit cognitivo</b>	Sim * <sup>b</sup>	Sim * <sup>c</sup>
<b>p tau <sup>d</sup></b>	↑109 % *	~
<b>Captação de glicose</b>	↓32 % *	↓21 % * <sup>e</sup>

<sup>a</sup>Resultados previamente publicados em Broetto et al (2016); <sup>b</sup>Labirinto aquático de Morris; <sup>c</sup>Teste de localização de objetos, vide Fig. 1B; <sup>d</sup>Phospho-tau (Ser 396)/razão actina; <sup>e</sup>Vide Fig. 1A. “~” representa sem alteração significativa entre o grupo veículo e AO. “\*” representa diferença significativa entre o grupo veículo e AO. Valores representados em percentuais em relação aos respectivos controles, considerados 100%.

A captação de glicose diminuiu significativamente no grupo AO, 12 semanas após administração do AO (Fig. 1A,  $p = 0,04$  e  $t = 2,31$ ). Na avaliação da memória de reconhecimento espacial, através do teste de localização de objetos, também houve um declínio estatisticamente significativo (Fig. 1B,  $p = 0,015$  e  $t = 2,82$ ) na média do índice de exploração ao objeto realocado no grupo AO, quando comparado ao veículo. No entanto, não houve correlação entre esses parâmetros (Fig. 1C,  $p = 0,38$ ,  $r = -0,39$ ).

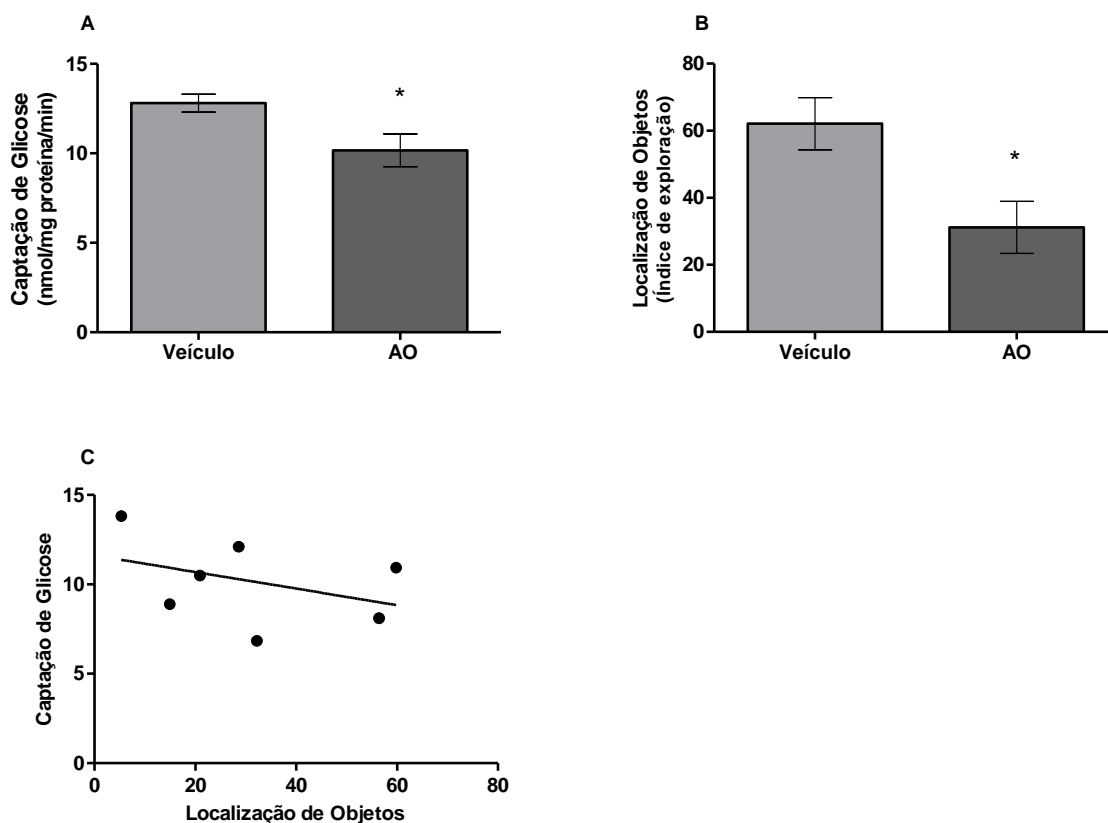


Figura 1. Memória de reconhecimento espacial e captação de glicose 12 semanas pós-infusão de AO ICV. (A) Fatias hipocampais de 0,3 mm foram incubadas em H<sup>3</sup>-glicose para medida da captação de glicose. (B) Índice de exploração ao objeto realocado no teste de localização de objetos. (Valores representados em média  $\pm$  erro padrão. \* representa diferença significativa do grupo controle/veículo). (C) Correlação entre a captação de glicose e o teste de localização de objetos através do coeficiente de correlação de Pearson.

Conclusões: 1) Estes dados mostram que há uma reversão espontânea dos parâmetros neuroquímicos analisados no modelo de demência com AO administrado ICV. É importante observar que a reversibilidade das alterações neste modelo deve levar em conta que trabalhamos com animais adultos, mas não idosos. Isso certamente contribui para a reversibilidade observada e deve ser matéria para estudos futuros, neste e em outros modelos; 2) Fica difícil, neste modelo, correlacionar tais parâmetros com o déficit cognitivo ainda persistente. Cabe salientar que no labirinto em Y o déficit cognitivo não foi percebido em 12 semanas. A tarefa no labirinto aquático não foi realizada nestes animais e representa uma limitação deste estudo comparativo; 3) Outro dado importante é que a redução na captação de glicose persiste neste modelo em 12 semanas. Embora o déficit no metabolismo da glicose frequentemente seja associado ao

déficit cognitivo, em pacientes (14,15) e modelos experimentais (16,17) essa correlação não foi observada em nossas condições. Enfim, estes dados contribuem para o entendimento das alterações neuroquímicas no modelo de demência com AO e reforçam a importância da alteração do metabolismo da glicose em pacientes diabéticos e com DA, embora sem apontar uma relação direta entre o déficit cognitivo e a redução da captação de glicose.

#### Referência bibliográficas:

1. Castellani RJ, Lee H, D P, Zhu X, Perry G, Smith M a. Alzheimer's Disease Pathology As a Host Response. October. 2009;67(6):523–31.
2. Najem D, Bamji-Mirza M, Chang N, Liu QY, Zhang W. Insulin resistance, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*. 2014;25(4):509–25.
3. Selkoe DJ. Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Physiological reviews*. 2001;81(2):741–66.
4. Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJM, Van Gool WA, Hoozemans JJM. The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2006;113(11):1685–95.
5. Mosconi L, Mistur R, Switalski R, Tsui WH, Glodzik L, Li Y, et al. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer ' s disease. 2009;811–22.
6. Grieb P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular neurobiology*. 2016;53(3):1741–52.
7. Pradip Kumar Kamat CN. Okadaic acid : a tool to study regulatory mechanisms for neurodegeneration and regeneration in Alzheimer ' s disease. *Neural Regeneration Research*. 2015;10(3):2015–7.
8. Broetto N, Hansen F, Brolese G, Batassini C, Lirio F, Galland F, et al. Intracerebroventricular administration of okadaic acid induces hippocampal glucose uptake dysfunction and tau phosphorylation. *Brain research bulletin*. 2016;124:136–43.
9. Costa AP, Tramontina AC, Biasibetti R, Batassini C, Lopes MW, Wartchow KM, et al. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behavioural Brain Research*. 2012;226(2):420–7.
10. Kamat PK, Tota S, Rai S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, et al. Okadaic acid induced neurotoxicity leads to central cholinergic dysfunction in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2012;690(1–3):90–8.

11. Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: The effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Experimental Brain Research*. 1997;113(3):509–19.
12. Ferguson D, Sapolsky R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(30):8046–52.
13. Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN. Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behavioural Brain Research*. 2009;204(1):206–11.
14. Willette, A. A. et al. Association of insulin resistance with cerebral glucose uptake in late middle-aged adults at risk for Alzheimer’s disease. *JAMA Neurology*. 2015;72(9):1013-1020.
15. Mosconi L, Sorbi S, de Leon MJ, Li Y, Nacmias B, Myoung PS, et al. Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer’s disease. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2006;47(11):1778–86.
16. Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Candeias E, Santos MS, et al. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: Major players in Alzheimer’s disease and diabetes interrelation. *Brain Research*. 2012;1441:64–78.
17. Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer’s disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology*. 2013;108:21–43.

### PARTE III

## DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos em demência, particularmente a causada pela doença de Alzheimer, que é responsável por 70% dos casos de demência, vêm ganhando destaque na comunidade científica por retratar aspectos gerais da abrangência desta morbidade na população mundial. Estes estudos são relevantes, pois possuem grande impacto socioeconômico, já que a população mundial vem aumentando cada vez mais sua expectativa de vida, portanto, entender os fatores do surgimento, os parâmetros de controle e as terapêuticas para esta doença é fundamental para o avanço da compreensão e tratamento da mesma (CASTELLANI et al., 2009; PRINCE et al., 2013; CHATTERJEE et al., 2015).

Dentre os achados neuropatológicos observados na DA, os emaranhados neurofibrilares formados a partir da hiperfosforilação da proteína tau e a deposição das placas contendo a proteína beta-amilóide, são os principais reportados pela literatura (CASTELLANI et al., 2009; SCHELTENS et al., 2016). Apesar de serem relevantes marcadores da doença, os mesmos são mais evidentes quando o processo patológico se instalou há algum tempo e o grau de disfunção e declínio da cognição são notórios. Desta forma, estudos têm corroborado com evidências de alterações patológicas que precedem e/ou podem estar associadas aos dois principais achados (emaranhados neurofibrilares e placas beta-amilóide), como exemplo, a disfunção astrogliar, com evidências tanto na doença de Alzheimer, quanto em outras doenças neurodegenerativas (CHEN; ZHONG, 2013; DE STROOPER; KARRAN, 2016).

Na busca da compreensão dos eventos patológicos encontrados na DA, o modelo animal induzido pelo ácido ocaídico através da infusão intracerebroventricular (KAMAT et al., 2010; 2012; 2014b) ou intrahipocampal (COSTA et al., 2012) tem sido utilizado para o estudo de eventos associados à hiperfosforilação da proteína tau. A

toxina AO é conhecida por atuar como um inibidor seletivo das proteínas fosfatases 1 e 2A e ocasionar a hiperfosforilação da proteína tau (ARENDRT et al., 1998; SUN et al., 2003); bem como disfunções cognitivas, na transmissão glutamatérgica, neuroinflamatórias, estresse oxidativo e neurodegenerativas (KAMAT et al., 2010; 2012; 2014b). Desta forma, analisar a resposta neuroglial é essencial para melhor entender a patogênese da DA e de outras doenças neurodegenerativas, permitindo assim que novas estratégias terapêuticas sejam sugeridas.

Nesta tese foram obtidos resultados oriundos e expressos em dois artigos, os quais visaram avaliar *in vivo* a infusão intracerebroventricular de duas doses distintas de ácido ocadáico e seus efeitos após 3 e 12 semanas, bem como efeitos agudos do ácido ocadáico *in vitro*, através do tratamento de fatias hipocampais em duas doses distintas.

1. Modelo de demência pela infusão ICV de ácido ocadáico na dose de 200ng produz alterações comportamentais e neurogliais.

Estudos mostram que animais submetidos a infusão ICV ou intrahipocampal de AO apresentam declínio cognitivo quando avaliados em teste comportamental, como o labirinto aquático de Morris (COSTA et al., 2012; KAMAT et al., 2010; 2012), tarefa utilizada para testar a memória de reconhecimento espacial pela observação da latência dos animais em encontrar a plataforma. O declínio cognitivo também foi encontrado em nosso estudo, uma vez que os animais infundidos com AO na dose de 200ng apresentaram uma latência aumentada para encontrar a plataforma no dia do teste (após serem treinados por 6 dias consecutivos), indicando o prejuízo cognitivo através do déficit na memória de reconhecimento espacial. O labirinto aquático de Morris é amplamente reconhecido por avaliar a integridade hipocampal, estrutura cerebral particularmente vulnerável e altamente afetada na DA. Embora outras tarefas

comportamentais como o labirinto em Y ou reconhecimento de objetos, têm sido utilizadas na literatura para caracterizar o déficit cognitivo de roedores (ANTUNES; BIALA, 2012; DELLU et al., 1997, 2000).

Além da alteração da cognição, observar algum dos achados neuropatológicos como encontrados em encéfalos de pacientes com DA, auxilia na compreensão do processo patológico da doença. Assim, através da inibição seletiva das fosfatases 1 e 2A induzidas pela exposição ao ácido ocadáico, obtivemos em nosso estudo a hiperfosforilação da proteína tau (no sítio Ser 396), sem mudança na quantidade de tau total. Até onde sabemos, no modelo animal induzido pela toxina AO esta é a primeira vez que o aumento da fosforilação neste sítio é reportado. Há evidências *in vitro* de que este sítio é chave na formação dos emaranhados neurofibrilares (TROJANOWSKI; LEE, 2013).

Em condições fisiológicas, a fosforilação da proteína tau ocorre em múltiplos sítios (STOOTHOFF; JOHNSON, 2005), desta forma, quando ocorre nos sítios Ser262 e Thr231/Ser235 é capaz de regular a interação da tau com os microtúbulos. Porém, a hiperfosforilação desses sítios, que pode ocorrer em condições de desequilíbrio de fosfatases e/ou cinases, favorece a desagregação da tau com os microtúbulos e ainda, gera a posterior fosforilação dos sítios Ser396/404, os quais são considerados sítios fibrilogênicos. Em encéfalos de pacientes com DA, a fosfatase 2A apresenta-se diminuída (ZHOU et al., 2008) e como já reportado nesta tese, em modelo animal, o ácido ocadáico é capaz de inibir a PP2A. Em condições fisiológicas, as fosfatases PP2A e PP2B são capazes de desfosforilar a Ser396 (LEE et al., 2001), porém se a mesma é inibida quando há exposição ao ácido ocadáico, esse mecanismo de desfosforilação não ocorre e gera uma hiperfosforilação da tau na Ser396, como hipotetizamos e mostramos neste estudo. Quando há a fosforilação anormal de sítios fibrilogênicos, como o da



Ser396, pode-se obter como resposta a formação de oligômeros e subsequentemente de filamentos da tau, os quais perdem a capacidade de manter sua função fisiológica. A diminuição da interação da tau com os microtúbulos, que pode resultar na desagregação microtubular, juntamente com o aumento da auto-associação de filamentos da tau, contribui para a formação de emaranhados neurofibrilares (STOOTHOFF; JOHNSON, 2005). Portanto, com a perda da função da tau normal, da estabilização e da manutenção dos microtúbulos, combinada a toxicidade que ela adquire, pode gerar um comprometimento no transporte axonal e contribuir para a degeneração sináptica e disfunção celular, as quais conseqüentemente podem levar a morte neuronal (CASTELLANI et al., 2009).

É interessante notar que um dos mecanismos chave para a morte neuronal na DA também envolve o prejuízo no metabolismo energético (SALKOVIC-PETRISIC et al., 2013). Desta forma, além dos achados neuropatológicos clássicos serem importantes para a validação de modelos animais de demência, o metabolismo da glicose também tem surgido como um importante achado a ser estudado em modelos animais. Uma vez que o prejuízo no metabolismo da glicose cerebral é uma característica patofisiológica da DA (GRIEB, 2016) e, pelo menos em parte, este prejuízo é causado por uma redução na captação de glicose glial. Em nosso estudo, nós observamos uma redução da captação de glicose no hipocampo de animais infundidos nas doses de 100ng e de 200ng de AO, sendo esta redução mais pronunciada na maior dose. A redução da captação da glicose já foi também observada no modelo animal induzido pela estreptozotocina ICV (BIASIBETTI et al., 2013; DUELLI et al., 1994), mas até onde sabemos, no modelo animal induzido pelo ácido ocadáico ainda não havia sido reportado na literatura.

O hipometabolismo da glicose cerebral parece preceder o prejuízo cognitivo e isso pode justificar, em parte, pelo elevado risco de pacientes diabéticos desenvolverem a DA (CHEN; ZHONG, 2013; WEINSTOCK; SHOHAM, 2004). Além disso, indivíduos portadores de genes da DA têm mostrado sinais de redução da captação de glicose cerebral, através da mensuração de áreas metabólicas ativas em seus encéfalos. O hipometabolismo da glicose pode ser detectável por até três décadas antes do início dos sintomas clínicos nestes pacientes portadores dos genes da DA familiar e ainda, parece ser independente da atrofia estrutural cerebral que esses indivíduos estão sujeitos (MOSCONI et al., 2006). A glicose captada tem diversos destinos, além do energético, que inclui a síntese de glutamato (e GABA), a síntese e reciclagem de glutatona e a síntese de lipídios, particularmente colesterol. Vias todas dependentes da atividade astrogliar (BÉLANGER et al., 2011; CHEN; ZHONG, 2013; EROL, 2008; OSBORN et al., 2015).

Além da captação de glicose, investigamos outros parâmetros marcadores astrogliais, GFAP e S100B, que quando alterados são considerados sinais de reatividade astrogliar. Neste trabalho encontramos um aumento do imunocontéudo da GFAP hipocampal, quando administramos AO na dose de 200ng. O aumento da GFAP é um sinal de astrogliose e tem sido considerada uma importante característica na DA. Este achado neuropatológico é identificado pelo aumento da expressão de GFAP e pela hipertrofia dos astrócitos ao redor do depósito de placas beta-amilóides (OSBORN et al., 2015). E ainda, a astrogliose parece aumentar linearmente com o declínio cognitivo (SERRANO-POZO et al., 2011).

Assim como encontramos alteração na GFAP hipocampal, encontramos também na S100B, a qual apresentou uma diminuição em ambas as doses de AO, 100ng e 200ng, no LCR. Nossos achados corroboram com outros modelos de demência, como

na STZ (BIASIBETTI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2011), hipoperfusão cerebral crônica (VICENTE et al., 2009) e na infusão intrahipocampal de AO (COSTA et al., 2012). A investigação da proteína S100B em estudos comportamentais foi uma das primeiras evidências da participação dos astrócitos na modulação da plasticidade sináptica (NISHIYAMA et al., 2002). O exato mecanismo de ação sobre esse processo ainda não está totalmente esclarecido. Porém, sabe-se que a S100B extracelular, funciona como uma citocina neurotrófica (GONÇALVES et al., 2008), sugerindo que ela possa ter um relevante papel nos processos fisiológicos de aprendizado e memória.

Desta forma, considerando a atividade neurotrófica da proteína S100B, a diminuição extracelular no modelo induzido pelo AO pode ser reflexo da diminuição da capacidade astrogliar em secretar a S100B em resposta à uma lesão. A diminuição da atividade astrogliar (incluindo o metabolismo da glicose) tem sido proposta como eventos precedentes nos casos de demência, particularmente a causada pela doença de Alzheimer (MOSCONI et al., 2009; RASKIN et al., 2015). Nós acreditamos que a diminuição da S100B no LCR pode ser um marcador útil e complementar ao prejuízo cognitivo e a demência.

Os astrócitos desempenham papel essencial na transmissão glutamatérgica, uma vez que, participam da sinapse tripartite e desta forma, realizam a captação do glutamato a partir da fenda sináptica. E ainda, a síntese de glutamato que ocorre a partir da glutamina é mediada pela GS, processo este que ocorre nos astrócitos (WALTON; DODD, 2007). A captação de glutamato pelos astrócitos previne a excitotoxicidade glutamatérgica; e o distúrbio na homeostase do glutamato captado pelo astrócito pode gerar um desequilíbrio do mesmo, uma disfunção, ou ainda, morte neuronal (DANBOLT, 2001). De fato, o modelo animal de demência induzido pelo AO parece causar mudanças na neurotransmissão glutamatérgica. A administração intrahipocampal

de AO, por exemplo, mostrou uma disfunção glutamatérgica que pode ser revertida pela memantina (ZIMMER et al., 2012). Recentemente, foi observado um aumento na expressão de duas subunidades de receptores de NMDA (NR1 e NR2), indicando a disfunção glutamatérgica no modelo animal de demência induzido pelo AO (KAMAT et al., 2014b). Além disso, em um estudo realizado em nosso grupo de pesquisa, o AO intrahipocampal mostrou uma diminuição da GS hipocampal, bem como redução do transportador de glutamato EAAT2, apesar de não apresentar alteração na captação de glutamato (COSTA et al., 2012). O mesmo foi observado neste estudo no que se refere a não apresentar alterações na captação de glutamato hipocampal, mas não encontramos alteração na glutamina sintetase. Apesar de não encontrarmos alterações nos resultados da captação e conversão glutamatérgica, se observarmos a razão captação de glutamato/GFAP, onde há uma tendência a diminuir a captação de glutamato em contraste com um aumento da GFAP, desta forma, pode sugerir a capacidade reduzida de captação de glutamato pelas células gliais, possivelmente contribuindo para a excitotoxicidade mediada por receptores NMDA.

Quanto ao conteúdo da glutathiona reduzida (GSH), o mesmo não apresentou alterações nas condições estudadas. Nossos resultados contrastam com estudos prévios, onde houve redução do conteúdo da GSH após infusão ICV de AO (KAMAT et al., 2010; 2014b). E ainda, independentemente de diferenças metodológicas, também foi observado diminuição da GSH após a infusão de AO intrahipocampal, estudo este realizado em nosso laboratório (COSTA et al., 2012). Além disso, ao que parece, na DA a capacidade antioxidante do sistema nervoso se apresenta diminuída (MOHANDAS et al., 2009). Apesar da discrepância em nossos resultados com o encontrado na literatura, consideramos que o estresse oxidativo foi pouco investigado no presente trabalho, uma vez que só mensuramos a GSH, dificultando maiores conclusões sobre a capacidade

antioxidante nas condições utilizadas em nosso estudo, no modelo induzido por ácido ocadáico.

Portanto, o modelo de administração ICV do AO na dose de 20 ng/ $\mu$ L foi claramente capaz de provocar alterações encontradas na DA e/ou outros modelos de demência – déficit cognitivo acompanhado de mudanças neuroquímicas hipocampais – aumento da fosforilação da tau (no sítio 396), astrogliose (sinalizadas pelas alterações da GFAP hipocampal e de S100B no líquido) e redução da captação de glicose.

Tabela 2. Tabela comparativa de modelos de demência induzida por ácido ocadáico em ratos.

<b>Espécie</b>	<b>Via</b>	<b>Tempo avaliações</b>	<b>Alterações cognitivas</b>	<b>Alterações neuroquímicas</b>	<b>Referências</b>
Sprague Dawley	ICV	3 semanas	↓ cognitiva no labirinto aquático	↓GSH, ↑nitrito, ↑cálcio, ↓células piramidais	KAMAT et al., 2014
Sprague Dawley	ICV	3 semanas	Não foi testado	↓IL $\beta$ , ↑TNF, ↑nitrito, ↑espécies reativas de oxigênio	KAMAT et al., 2012b
Sprague Dawley	ICV	3 semanas	↓ cognitiva no labirinto aquático	↓nível e atividade acetilcolina, ↓acetilcolinesterase, ↓receptor nicotínico	KAMAT et al., 2012a
Sprague Dawley	ICV	3 semanas	↓ cognitiva no labirinto aquático	↓GSH, ↑nitrito, ↑espécies reativas de oxigênio, ↑ cálcio mitocondrial	KAMAT et al., 2010
Wistar	ICV	3 semanas	↓ cognitiva no labirinto aquático	↑fosforilação da tau, ↑GFAP, ↓S100B, ↓captação glicose	BROETTO et al., 2016
Wistar	IH	3 semanas	↓ cognitiva no labirinto aquático	↓S100B LCE ~ glutamato, ↓EAAT2, ↓GSH, ↓GS, ↑ GFAP HC	COSTA et al., 2012

2. Exposição aguda de fatias hipocâmpais ao ácido ocaadáico induz a hiperfosforilação da proteína tau, mas não altera parâmetros gliais.

Ainda no primeiro artigo foi observado que fatias hipocâmpais expostas ao ácido ocaadáico nas doses 0,3 ng/ $\mu$ L e 0,6 ng/ $\mu$ L apresentaram-se experimentalmente apropriadas, uma vez que em ensaios de integridade (LDH) e viabilidade (MTT) não apresentaram-se alteradas. A incubação das fatias hipocâmpais com AO foi realizada durante 1 hora e após serem avaliadas quanto a parâmetros neuroquímicos, as mesmas apresentaram hiperfosforilação da proteína tau (Ser396) e aumento da razão tau fosforilada/ tau total na dose de 0,6 ng/ $\mu$ L. O que demonstra o efeito direto do AO em inibir as proteínas fosfatases e em induzir a hiperfosforilação da proteína tau (no sítio Ser 396).

Apesar da hiperfosforilação da proteína tau (Ser 396) na dose de 0,6 ng/ $\mu$ L, a exposição de fatias hipocâmpais ao ácido ocaadáico não foi capaz de induzir mudanças na captação de glicose. Diversas hipóteses podem estar envolvidas nestes achados. A ideia mais simples é que o AO, nas condições utilizadas neste estudo, não afetou a captação de glicose em fatias hipocâmpais e que o efeito *in vivo* envolve alterações em longo prazo como a expressão de transportador(s) ou a regulação deste(s) transportador(s). E ainda, sugere-se que os efeitos do AO dependem do tipo celular, concentração e tempo de exposição à toxina (ATKINSON et al., 2009). Sabe-se que o AO, quando em níveis  $\mu$ M de concentração, é capaz de influenciar o metabolismo da glicose no músculo esquelético (TANTI et al., 1991), em hepatócitos (QUENTMEIER et al., 1993) e em adipócitos (LI et al., 1996). Enquanto, na concentração de 10 nM, o AO parece proteger neurônios corticais da privação de oxigênio e glicose (ATKINSON et al., 2009), porém, pode ser letal em concentrações de 40 nM ou mais (YI et al., 2005). Os mecanismos que envolvem os efeitos do AO no metabolismo da glicose ainda não

são totalmente compreendidos, mas envolvem mudanças nas atividades enzimáticas (devido ao estado de fosforilação de proteínas) e expressão de proteínas (VALDIGLESIAS et al., 2012). A exposição direta de fatias hipocâmpais ao AO também não afetou significativamente a captação de glutamato, como também observamos *in vivo*. Além disso, também não encontramos mudança na secreção de S100B e na atividade da GS nas fatias expostas ao AO (dados não mostrados).

### 3. Modelo de demência com AO é parcialmente reversível após 12 semanas.

Num grupo de animais experimentais expostos ao AO estudamos se as mudanças observadas em 3 semanas se manteriam em 12 semanas. Analisamos em 12 semanas os mesmos parâmetros neuroquímicos, porém a cognição foi avaliada por testes de localização de objetos e labirinto em Y.

Um dos principais achados neuroquímicos encontrado após 3 semanas da infusão de AO foi a hiperfosforilação da proteína tau na Ser 396. Esse resultado não foi encontrado no tempo de 12 semanas. Isso sugere a reversibilidade do efeito do AO, administrado ICV, numa única dose. Note que observamos um efeito direto e agudo (1 h) do AO em fatias hipocâmpais sobre a fosforilação. Portanto, poderíamos pensar que esse efeito seria direto sobre a tau e desapareceria com o *wash-out* da toxina. No entanto, não temos informações sobre sua possível metabolização.

É importante ressaltar que nosso estudo iniciou (período de infusão da toxina) quando os animais tinham 3 meses de idade e ao avaliarmos os parâmetros neuroquímicos, os mesmos estavam a completar 6 meses de idade, sendo classificados ainda como adultos, mas não senis (COQ; XERRI, 2000). Quando observamos achados em pacientes com DA do tipo esporádica, verificamos que a grande prevalência é no período da senescência, tornando-se cada vez mais evidente com o processo de

envelhecimento. Sabe-se que com o envelhecimento o encéfalo responde de forma mais lenta à injúria (FREEMANTLE et al., 2006) e ainda, pode apresentar algum declínio da função cognitiva, sem necessariamente ser patológico, como por exemplo, a dificuldade na memória episódica, ou seja, recordar conscientemente de eventos (GRADY, 2013). Em roedores, por exemplo, observou-se uma diminuição de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o qual pode contribuir para prejuízos cognitivos (ADLARD et al., 2005; MORA, 2013). Portanto, não podemos descartar que uma infusão ICV mais tarde de AO, por exemplo, aos 24 meses (que corresponde a fase senil em ratos Wistar) ou mesmo 16 meses (fase pré-senil) (COQ; XERRI, 2000), leve a mudanças cognitivas e neuroquímicas permanentes devido à menor plasticidade e capacidade de recuperação.

Estudos que avaliam modelos animais ao longo do tempo são importantes para que seja possível estudar os mecanismos neuropatológicos, bem como a eficácia terapêutica de fármacos, entre outras intervenções. Até então, na infusão de AO tanto ICV quanto intrahipocampal, o modelo animal só havia sido estudado em até 3 semanas pós infusão. Portanto, este estudo lança uma importante questão sobre a reversibilidade deste modelo.

Cabe mencionar que no modelo com a infusão ICV de STZ é mencionado que alterações cognitivas e neuroquímicas desencadeadas possuem um padrão tempo-dependente, que consiste em três fases: (1) Aguda, dentro de um mês; (2) 1-3 meses, onde há tendência de normalizar os parâmetros (por exemplo, melhora parcial ou completa do declínio cognitivo em 3 meses); e 6-9 meses, onde há descompensação com agravamento lento e progressivo (KNEZOVIC et al., 2015).

A doença de Alzheimer está associada ao prejuízo progressivo de vários aspectos cognitivos, incluindo desorientação espacial e falhas na memória episódica,



bem como, déficits na memória de reconhecimento e olfatória (BUCK et al., 1997; YASSINE et al., 2013). Dentre as estruturas cerebrais envolvidas na memória, o hipocampo é conhecido por desempenhar um papel crucial na memória de localização de objetos (BOHBOT et al., 2002) e ainda, juntamente com o córtex entorrinal, é o local de início das disfunções causadas pela DA e onde as alterações se apresentam de forma mais severa (PUZZO et al., 2014).

Em nosso estudo, ao avaliarmos a cognição de animais na 11ª semana pós-infusão de AO, foi realizado os testes de localização de objetos e labirinto em Y, ambos os testes avaliam a memória de reconhecimento espacial e observamos declínio cognitivo somente na tarefa de localização de objetos. O teste comportamental de localização de objetos é baseado na tendência natural exploratória de roedores, sem a necessidade de reforço positivo ou negativo para que ele realize o comportamento (MORELLINI, 2013). Assim, os animais foram previamente expostos a dois objetos idênticos, a posteriormente, explorar um dos objetos (realocado para uma nova localização espacial) por um tempo maior que o objeto não deslocado. Desta forma, os animais que receberam a infusão ICV de AO não exploraram por mais tempo o objeto realocado, indicando um declínio da memória de reconhecimento espacial. Esta tarefa tem sido utilizada na avaliação de memórias dependentes do hipocampo (ASSINI et al., 2009; FERGUSON; SAPOLSKY, 2007). Além disso, há indícios de que a região dorsal do hipocampo desempenha um papel crucial, especialmente quando a informação contextual ou espacial é um fator relevante (GOULART et al., 2010).

Mesmo com o declínio cognitivo apresentado no teste de localização de objetos, não encontramos o mesmo no labirinto em Y, uma vez que os animais que receberam a infusão ICV de AO não apresentaram um maior tempo de exploração do braço que havia sido previamente bloqueado. Alguns estudos apontam evidências da participação

não somente do sistema hipocampal neste comportamento, mas também do córtex parietal posterior em experimentos em roedores (KESNER et al., 1993; MCDONALD; WHITE, 1993). Desta forma, acreditamos que o comportamento realizado pelo animal no teste labirinto em Y, necessite também de estruturas que possivelmente não foram prejudicadas na infusão ICV de AO e por isso, não demonstraram alterações, apesar do déficit encontrado no teste de localização de objetos. Entretanto, uma limitação deste trabalho, foi a de que não realizamos o labirinto aquático em 12 semanas pós-infusão e isto teria sido mais adequado para comparar com os resultados em 3 semanas.

Na janela temporal de 12 semanas após infusão de AO, encontramos também uma diminuição da captação de glicose hipocampal, mostrando que o hipometabolismo da glicose persiste neste modelo de 12 semanas. Como já observado no modelo induzido pela STZ em 4 semanas (BIASIBETTI et al., 2016), 6 semanas pós infusão (DUELLI et al., 1994), 7 semanas (BIASIBETTI et al., 2013) e 8 semanas (BIASIBETTI et al., 2016).

O déficit no metabolismo da glicose frequentemente é associado ao déficit cognitivo, em pacientes (MOSCONI et al., 2006; WILETTE et al., 2015) e modelos experimentais (CHEN; ZHONG, 2013; CORREIA et al., 2012). Considerando que ambas as alterações estavam presentes em 3 semanas e persistiram em 12 semanas em nosso estudo, poderíamos buscar a possibilidade de uma correlação entre elas. Entretanto, essa correlação, não foi encontrada.

## CONCLUSÕES

Estes dados contribuem para o entendimento das alterações neuroquímicas no modelo de Alzheimer, com AO administrado ICV em ratos, caracterizando além do déficit cognitivo, pelo aumento da fosforilação da tau (conectada aos emaranhados neurofibrilares), pela astrogliose e pela redução do metabolismo da glicose. Portanto, o modelo se mostra adequado para avaliação das alterações neuroquímicas, bem como para avaliação da eficácia de estratégias neuroprotetoras. Os dados reforçam a importância de investigar alterações do metabolismo cerebral da glicose em pacientes diabéticos e/ou indivíduos com déficits cognitivos, embora nossos dados não tenham apontado uma correlação de ambos. Adicionalmente, nossos dados apontam para uma reversibilidade do modelo em longo prazo, indicando a necessidade de cautela na avaliação de estratégias terapêuticas com este modelo.

## PERSPECTIVAS

- 1) Análise de alterações neurogliais e comportamentais no modelo induzido pela infusão ICV de AO com ratos senis.
- 2) Investigação da cognição em diferentes tempos pós-infusão de AO utilizando o mesmo teste comportamental.
- 3) Medida de transportadores de glicose, GLUT-1 e GLUT-3, bem como de receptores de insulina no modelo induzido pelo AO ICV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOV, A.Y. et al. Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, v. 23, p. 5088-5095, 2003.
- ADLARD, P. A.; PERREAU, V. M.; COTMAN, C. W. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiology of Aging*, v. 26, p. 511–520, 2005.
- 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.
- ARENDET, T. et al. Phosphorylation of Tau , A $\beta$ -Formation, and Apoptosis After In Vivo Inhibition of PP-1 and PP-2A. *Neurobiology of Aging*, v. 19, n. 1, p. 3–13, 1998.
- ARIAS, C. et al. The Protein Phosphatase Inhibitor Okadaic Acid Induces Heat Shock Protein Expression and Neurodegeneration in Rat Hippocampus in Vivo. *Experimental Neurology*, v. 254, n. 153, p. 242–254, 1998.
- ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behavioural Brain Research*, v. 204, n. 1, p. 206–211, 2009.
- ATKINSON, T.; WHITFIELD, J.; CHAKRAVARTHY, B. The phosphatase inhibitor, okadaic acid, strongly protects primary rat cortical neurons from lethal oxygen-glucose deprivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 378, n. 3, p. 394–398, 2009.
- BABA, H. et al. GFAP gene expression during development of astrocytes. *Developmental Neuroscience*, v. 19, n. 1, p. 49-57, 1997.
- BAINS, J. S.; SHAW, C. A. Neurodegenerative disorders in human: The role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*, v. 25, n. 3, 335-358, 1997.
- BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, v. 14, n. 6, p. 724–738, 2011.

BIASIBETTI, R. et al. Green tea ( - ) epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *v. 236, p. 186–193, 2013.*

BIASIBETTI, R. et al. Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. *Behavioral Brain Research*, *v. 316, p. 205-214, 2016.*

BOHBOT, V. D. et al. Rat spatial memory tasks adapted for humans: Characterization in subjects with intact brain and subjects with medial temporal lobe lesions. *Physiological Research*, *v. 51, n. SUPPL. 1, 2002.*

BOUZIER, A. K. et al. Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *European Journal of Neuroscience*, *v. 24, p. 1687-1694, 2006.*

BUCK, B. H. et al. Spatial- and object-based attentional deficits in Alzheimer's disease. Relationship to HMPAO-SPECT measures of parietal perfusion. *Brain*, *v. 120, n. 7, p. 1229–1244, 1997.*

CAGNOLI, C. M. et al. Apoptosis induced in neuronal cultures by either the phosphatase inhibitor okadaic acid or the kinase inhibitor staurosporine is attenuated by isoquinolinesulfonamides H-7, H-8, and H-9. *Journal of Molecular Neuroscience*, *v. 7, n. 1, p. 65–76, 1996.*

CALABRESE, V. et al. Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxidant Redox Signal*, *v. 8, p. 1975-1986, 2006.*

CASTELLANI, R. J. et al. Alzheimer's Disease Pathology As a Host Response. *October*, *v. 67, n. 6, p. 523–531, 2009.*

CHEN, Z.; ZHONG, C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: Implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology*, *v. 108, p. 21–43, 2013.*

COQ, J.; XERRI, C. Age-related alteration of the forepaw representation in the rat primary somatosensory cortex. *Neuroscience*, *v. 99, n. 3, p. 403–411, 2000.*

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.

COSTA, A. P. et al. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behavioural Brain Research*, v. 226, n. 2, p. 420–427, 2012.

CRAFT, J. M. et al. Interleukin 1 receptor antagonist knockout mice show enhanced microglial activation and neuronal damage induced by intracerebroventricular infusion of human  $\beta$ -amyloid. *Journal of Neuroinflammation*, v. 2, n. 15, p. 1-9, 2005.

CUDKOWICZ, M. E. et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of Procysteine in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, v. 52, n. 7, p. 1492-1494, 1999.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, v. 65, n. 1, p. 1–105, 2001.

DE STROOPER, B.; KARRAN, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, v. 164, n. 4, p. 603–615, 2016.

DELLU, F. et al. Extension of a new two-trial memory task in the rat: influence of environmental context on recognition processes. *Neurobiology of learning and memory*, v. 67, n. 2, p. 112–20, 1997.

DELLU, F. et al. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiology of learning and memory*, v. 73, n. 1, p. 31–48, 2000.

DONATO, R. et al. Functions of S100 proteins. *Current molecular medicine*, v. 13, n. 1, p. 24–57, 2013.

DONATO, R. et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1793, n. 6, p. 1008–1022, 2009.

DUELLI, R. et al. Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 12, n. 8, p. 737–743, 1994.

EIKELENBOOM, P. et al. The significance of neuroinflammation in understanding

Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, v. 113, n. 11, p. 1685–1695, 2006.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial Fibrillary Acidic Protein : GFAP- Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochemical Research*, v. 25, n. 9–10, p. 1439–1451, 2000.

EROL, A. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, v. 13, n. 3, p. 241–253, 2008.

FERGUSON, D.; SAPOLSKY, R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 27, n. 30, p. 8046–8052, 2007.

FREEMANTLE, E. et al. Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 75, n. 3, p. 213–220, 2006.

GOMES, F. C. A.; PAULIN, D.; NETO, V. M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): Modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, n. 5, p. 619–631, 1999.

GONÇALVES, C. A.; CONCLI LEITE, M.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical Biochemistry*, v. 41, n. 10–11, p. 755–763, 2008.

GOULART, B. K. et al. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, v. 167, n. 4, p. 969–973, 2010.

GRADI, C. Trends in neurocognitive aging. *Nature Review Neuroscience*, v. 13, n. 7, p. 491-505, 2013.

GRIEB, P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. *Molecular neurobiology*, v. 53, n. 3, p. 1741–52, 2016.



HALLSCHMID, M.; SCHULTES, B. Central nervous insulin resistance: a promising target in the treatment of metabolic and cognitive disorders? *Diabetologia*, v. 52, n. 11, p. 2264–2269, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-009-1501-x>>.

HANNAN, S. B. et al. Cellular and molecular modifier pathways in tauopathies: The big picture from screening invertebrate models. *Journal of Neurochemistry*, v. 137, n. 1, p. 12–25, 2016.

HE, J. et al. Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *Journal of Neural Transmission*, v. 108, n. 12, p. 1435–1443, 2001.

HIRRLINGER, J.; DRINGEN, R. The cytosolic redox state of astrocytes: Maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. *Brain Research Review*, n. 63, 177-188, 2010.

HOYER, S. The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. *Journal of Neural Transmission*, v. 109, n. 3, p. 341–360, 2002.

IQBAL, K. et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1739, n. 2, p. 198–210, 2005.

JALBERT, J. J.; DAIELLO, L. A.; LAPANE, K. L. Dementia of the Alzheimer type. *Epidemiologic Reviews*, v. 30, n. 1, p. 15–34, 2008.

KAMAT, P. K.; TOTA, S.; RAI, S.; SWARNKAR, S.; et al. A study on neuroinflammatory marker in brain areas of okadaic acid (ICV) induced memory impaired rats. *Life Sciences*, v. 90, n. 19–20, p. 713–720, 2012.

KAMAT, P. K. et al. Mechanism of synapse redox stress in Okadaic acid (ICV) induced memory impairment: Role of NMDA receptor. *Neurochemistry International*, v. 76, p. 32–41, 2014a.

KAMAT, P. K. et al. Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application. *Molecular neurobiology*, v. 50, n. 3, p. 852–865, 2014b.

KAMAT, P. K. et al. Okadaic acid (ICV) induced memory impairment in rats: A

suitable experimental model to test anti-dementia activity. *Brain Research*, v. 1309, n. Icv, p. 66–74, 2010.

KAMAT, P. K.; TOTA, S.; RAI, S.; SHUKLA, R.; *et al.* Okadaic acid induced neurotoxicity leads to central cholinergic dysfunction in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 690, n. 1–3, p. 90–98, 2012.

KESNER, R. P.; BOLLAND, B. L.; DAKIS, M. Memory for spatial locations, motor responses, and objects: triple dissociation among the hippocampus, caudate nucleus, and extrastriate visual cortex. *Experimental Brain Research*, v. 93, n. 3, p. 462–470, 1993.

KNEZOVIC, A. *et al.* Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, v. 122, n. 4, p. 577–592, 2015.

LACKOVIĆ, Z.; REBIĆ, V.; RIEDERER, P. F. Single intracerebroventricular injection of botulinum toxin type A produces slow onset and long-term memory impairment in rats. *Journal of Neural Transmission*, v. 116, n. 10, p. 1273–1280, 2009.

LEE, V. M.; GOEDERT, M.; TROJANOWSKI, J. Q. Neurodegenerative tauopathies. *Annual Review of Neuroscience*, v. 24, 1121-159, 2001.

LEWERENZ, J.; MAHER, P. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence? *Frontiers in Neuroscience*, v. 9, n. DEC, p. 1–20, 2015.

LI, J. *et al.* Phenylarsine oxide and vanadate: apparent paradox of inhibition of protein phosphotyrosine phosphatases in rat adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1312, p. 223–230, 1996.

LOUZÃO, M. R. *et al.* Effect of okadaic acid on glucose regulation. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 5, 207-215, 2005.

MCDONALD, R. J. J.; WHITE, N. M. M. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, v. 107, n. 1, p. 3, 1993.

MOHANDAS, E. *et al.* Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian Journal of Psychiatry*. v. 51, n. 1, p. 55-61, 2009.

MOLOFSKY, A. V et al. Astrocytes and disease : a neurodevelopmental perspective. p. 891–907, 2012.

MORA, F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 15, n. 1, p. 45–52, 2013.

MORELLINI, F. Spatial memory tasks in rodents: what do they model? *Cell and Tissue Research*, v. 354, n. 1, p. 273–286, 2013.

MOSCONI, L. et al. FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, p. 811–822, 2009.

MOSCONI, L. et al. Hypometabolism exceeds atrophy in presymptomatic early-onset familial Alzheimer's disease. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, v. 47, n. 11, p. 1778–1786, 2006.

NISHIYAMA, N. et al. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *PNAS*, v. 99, p. 4037-4042, 2002.

OSBORN, L. M. et al. Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, v. 144, 121-141, 2015.

PEKONY, M. et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathologica*, v. 131, n. 3, p. 323–345, 2016.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 22, p. 10625–9, 1994.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, v. 32, n. 8, p. 421–431, 2009.

PRINCE, M. et al. The global prevalence of dementia : A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia*, v. 9, n. 1, p. 63–75.e2, 2013.

PUZZO, D. et al. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease:

Practical considerations and guidelines. *Biochemical Pharmacology*, v. 88, n. 4, p. 450–467, 2014.

QUENTMEIR, A. et al. Insulin-mimetic actions of phorbol ester in cultured adult rat hepatocytes: lack of phorbol-ester-elicited inhibition of the insulin signal. *Biochemical Journal*, v. 289 (Pt. 2), p. 549–555, 1993.

RASKIN, J. et al. Neurobiology of Alzheimer ' s Disease : Integrated Molecular , Physiological , Anatomical , Biomarker , and Cognitive Dimensions. p. 712–722, 2015.

RITCHIE, K.; LOVESTONE, S. The dementias. *Lancet*, v. 360, n. 9347, p. 1759–1766, 2002.

RODRIGUES, L. et al. Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model: Neuroprotection with aminoguanidine. *Advances in Alzheimer's Disease*, v. 1, p. 215–227, 2011.

RUSSELL R. L., et al. Increased neuronal glucose-6-phosphate dehydrogenase and sulfhydryl levels indicate reductive compensation to oxidative stress in Alzheimer disease. *Achieves Biochemical Biophysics*, 370, 236–239, 2009.

SALKOVIC-PETRISIC, M. et al. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *Journal of Neural Transmission*, v. 120, n. 1, p. 233–252, 2013.

SCHELTENS, P. et al. Alzheimer's disease. *The Lancet*, v. 6736, n. 15, p. 1–13, 2016.

SELKOE, D. J. Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Physiological reviews*, v. 81, n. 2, p. 741–766, 2001.

SERRANO-POZO, A. et al. Reactive Glia not only Associates with Plaques but also Parallels Tangles in Alzheimer ' s Disease. *AJPA*, v. 179, n. 3, p. 1373–1384, 2011.

STOOTHOFF, W. H.; JOHNSON, G. V. W. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1739, p. 280–297, 2005.

SUAREZ, I.; BODEGA, G.; FERNANDEZ, B. Glutamine synthetase in brain: Effect of ammonia. *Neurochemistry International*, v. 41, n. 2–3, p. 123–142, 2002.

SUN, L. et al. Inhibition of protein phosphatase 2A and protein phosphatase 1 induced tau phosphorylation and impairment of spatial memory retention in rats. *Neuroscience*, v. 118, p. 1175–1182, 2003.

TANTI, J. F. et al. Effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases-1 and -2A, on glucose transport and metabolism in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 2099-2103, 1991.

TROJANOWSKI, J.; LEE, V. The role of tau in Alzheimer's disease. *Medical Clinics of North America*, v. 2, n. 2, p. 60–65, 2013.

Yi, K. D. et al. Role of protein phosphatases in estrogen-mediated neuroprotection. *The Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 7191–7198, 2005.

VALDIGLESIAS, V. et al. Identification of differentially expressed genes in SHSY5Y cells exposed to okadaic acid by suppression subtractive hybridization. *BMC genomics*, v. 13, p. 46, 2012.

VICENTE, E. et al. Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Research*, v. 1251, p. 204-212, 2009.

WALTON, H. S.; DODD, P. R. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, v. 50, n. 7–8, p. 1052–1066, 2007.

WEINSTOCK, M.; SHOHAM, S. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. *Journal of Neural Transmission*, p. 347–366, 2004.

WILETTE, A. A. et al. Association of insulin resistance with cerebral glucose uptake in late middle-aged adults at risk for Alzheimer's disease. *JAMA Neurology*, v. 72, n. 9, p. 1013-1020, 2015.

WOODWARD, M.; BECKETT, N.; BEISER, A. Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men : A Pooled Analysis of 2 . 3 Million People Comprising More Than 100 , 000 Cases of Dementia. p. 1–8, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dementia: a public health priority. *Dementia*, p. 112, 2012.

Disponível em:<[http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458_eng.pdf)>.

YASSINE, N. *et al.* Detecting spatial memory deficits beyond blindness in tg2576 Alzheimer mice. *Neurobiology of Aging*, v. 34, n. 3, p. 716–730, 2013.

ZELMANN, R. *et al.* Pub Med Central CANADA. *Clinical Neurophysiology*, v. 123, n. 3, p. 106–116, 2013.

ZHOU, X. *et al.* Neurobiology of Disease Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A. *Neurobiology of Disease*, v. 31, p. 386–394, 2008.

ZIMMER, E. R. *et al.* Pretreatment with memantine prevents Alzheimer-like alterations induced by intrahippocampal okadaic acid administration in rats. *Current Alzheimer Disease*, v. 9, 1182-1190, 2012.